



Activation du gyrus dentelé par le noyau supramammillaire au cours du sommeil paradoxal chez le rongeur : étude neuroanatomique et fonctionnelle

Francesca Billwiller

► To cite this version:

Francesca Billwiller. Activation du gyrus dentelé par le noyau supramammillaire au cours du sommeil paradoxal chez le rongeur : étude neuroanatomique et fonctionnelle. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1025 . tel-01377030

HAL Id: tel-01377030

<https://theses.hal.science/tel-01377030>

Submitted on 6 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE NEUROSCIENCE ET COGNITION
DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)
soutenue publiquement le 08 Février 2016
par

Mlle Francesca BILLWILLER

Thèse réalisée sous la direction de Pierre-Hervé LUPPI
Centre de recherche en neuroscience de Lyon, INSERM U1028, CNRS UMR 5292
Equipe Sleep

**Activation du gyrus dentelé par le noyau
supramammillaire au cours du sommeil paradoxal chez
le rongeur: étude neuroanatomique et fonctionnelle.**

JURY :

Dr. Anne Didier
Dr. Veronique Fabre
Dr. Romain Goutagny
Dr. Monique Esclapez
Dr. Pierre-Hervé Luppi

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude du réseau neuronal responsable de l'activation corticale au cours du sommeil paradoxal (SP). Dans la première partie de ma thèse, j'ai participé à la démonstration par le laboratoire que contrairement à l'éveil, l'activation corticale pendant le SP n'est pas généralisée mais limitée à quelques structures limbiques, déterminantes pour l'apprentissage et la mémoire: le gyrus dentelé de l'hippocampe (GD), les cortex rétrosplénial, entorhinal médial, amygdalien et cingulé antérieur. De plus, nous avons montré que l'activation du GD au cours du SP est due à une projection issue d'un petit noyau hypothalamique, le noyau supramammillaire (Sum). J'ai ensuite montré dans ma thèse en combinant l'hybridation in situ d'un marqueur des neurones glutamatergiques (le transporteur vésiculaire 2 du glutamate, vGLUT2) et GABAergiques (le transporteur vésiculaire du GABA, vGAT) et l'immunohistochimie du FOS que les neurones du Sum latéral actifs pendant l'hypersomnie de SP sont à la fois glutamatergiques et GABAergiques (GLU/GABA). Par ailleurs, j'ai montré que l'augmentation du nombre de neurones exprimant FOS dans le GD dorsal pendant le rebond de SP est abolie après la lésion neurochimique du Sum, et que la lésion du Sum induit une nette réduction de la densité de fibres glutamatergiques dans le GD dorsal et pas dans le GD ventral. Enfin, j'ai éjecté un traceur rétrograde (Fluorogold, FG) dans le GD ventral et j'ai observé un grand nombre de neurones doublement marqués FOS-FG+ dans le cortex enthorinal médian. L'ensemble de ces résultats indique que les neurones granulaires du GD dorsal sont activés au cours de l'hypersomnie de SP par une projection des neurones GLU/GABA du Sum latéral, alors que ceux du GD ventral sont activés par une projection du cortex enthorinal médian. Le deuxième objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de l'activation de la voie Sum latéral-GD dorsal pendant le SP. Pour ce faire, j'ai mis en place pour la première fois au laboratoire la technique d'optogénétique sur des souris transgéniques vGLUT2-Cre afin d'inactiver ou activer les neurones GLU/GABA du Sum spécifiquement au cours des épisodes de SP. Nos résultats montrent que l'activation des fibres GLU/GABA provenant du Sum localisées dans le GD dorsal au cours du SP induit une augmentation de la fréquence et de la puissance du thêta enregistré dans le GD. Ces résultats indiquent que la voie Sum-GD dorsal contrôle le thêta hippocampique et soutiennent l'hypothèse d'un rôle de cette voie dans les processus de consolidation mnésique prenant place au cours du SP.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	8
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	13
1. Le cycle veille-sommeil.....	13
1.1 L'éveil (EV)	14
1.2 Le sommeil lent (SL).....	14
1.3 Le sommeil paradoxal (SP)	15
1.4 L'organisation du cycle veille-sommeil chez le rongeur.....	17
1.5 Les fonctions du SP	17
1.5.1 Le SP et le rêve.....	17
1.5.2 Le SP et la maturation cérébrale.....	18
1.5.3 Le SP et la neurogenèse.....	19
1.5.4 Le SP et la mémoire	19
2. L'activation des régions limbiques au cours du SP et de l'EV	23
2.1 Le claustrum	26
2.2 Le cortex cingulé antérieur.....	27
2.3 Le cortex rétrospénial.....	27
2.4 Le cortex amygdalien	28
3. L'activation de la formation hippocampique pendant le SP et l'EV	29
3.1 Le subiculum	29
3.2 L'hippocampe.....	29
3.2.1 Connexions intra-hippocampiques	30
3.2.2 Afférences à l'hippocampe.....	31
3.2.3 Efférences de l'hippocampe	31
3.2.4 Activité hippocampique pendant le SP et l'EV	31
3.3 Le septum	35
3.4 Le cortex entorhinal médian.....	36
4. Le gyrus dentelé (GD)	39
4.1 Anatomie du GD	39
4.2 Le GD sur son axe dorso-ventral.....	40
4.3 Le GD et la séparation des patrons d'information («pattern separation »).....	41
4.4 Le GD et la mémoire émotionnelle	43
4.5 Le GD et la neurogenèse	45

5. Le noyau supramammillaire (Sum).....	47
5.1 Afférences du Sum	47
5.2 Efferences du Sum.....	47
5.3 La voie de projection Sum-hippocampe.....	48
5.4 Rôle du Sum dans l'apprentissage.....	49
5.5 Rôle du Sum dans les mécanismes de génération du rythme thêta hippocampique.....	51
OBJECTIFS.....	53
ETUDE 1. Les neurones corticaux qui sont modifiés au cours du SP	56
1. Contexte.....	56
2. Article 1	57
ETUDE 2. Nature neurochimique des neurones SP-on du Sum	92
1. Contexte.....	92
2. Article 2	93
ETUDE 3. Rôle pendant le SP de la projection du Sum sur le GD.....	113
Matériels et méthodes	113
1. L'optogénétique	113
1.1 Principe.....	113
1.2 Opsines	114
1.3 Vecteurs viraux.....	117
1.4 Système inducible Cre	118
1.5 Genotypage.....	120
1.6. Optogénétique <i>in vitro</i>	121
1.6.1 Animaux et injection d'AAV	121
1.6.2 Electrophysiologie <i>in vitro</i>	121
1.6.3 Enregistrements extracellulaires LFP	122
1.6.4 Enregistrements intracellulaires en patch-clamp	123
1.6.5 Pharmacologie	124
1.7. Optogénétique <i>in vivo</i>	125
1.7.1 Animaux	126
1.7.2 Procédure chirurgicale d'injection d'AAV.....	126
1.7.3 Procédure chirurgicale d'implantation des fibres optiques	127
1.7.4 Récupération post-opératoire.....	128
1.7.5 Stimulations lumineuses	129
2. La polysomnographie.....	130
2.1 Principe et électrodes.....	130
2.2 Procédure chirurgicale d'implantation des électrodes.....	131

2.3 Acquisition des enregistrements polysomnographiques.....	132
2.4 Analyse des enregistrements polysomnographiques	132
2.5 Analyse spectrale.....	133
4. Perfusion et préparation histologique	134
4.1 Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde	134
4.2 Réalisation et conservation des coupes histologiques	135
4.3 Immunohistochimie.....	135
4.3.1 Principe de l'utilisation de la protéine FOS comme marqueur fonctionnel	135
4.3.2 Principe de l'immunohistochimie.....	136
4.3.3 Protocole détaillé d'immunohistochimie.....	137
4.3.4 Analyse des résultats histologiques	138
5. Analyses statistiques.....	139
Résultats	140
1. Vérification et validation de l'injection de l'AAV5 dans le Sum	140
2. Optogénétique <i>in vitro</i>	141
3. Optogénétique <i>in vivo</i>	142
3.1 ChR2.....	142
3.1.1 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur l'architecture des états de vigilance.....	142
3.1.2 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL dans le GD sur les caractéristiques du LFP	143
3.1.4 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur l'expression de FOS	148
3.2 eNPh3.0	149
3.2.1 Effet de l'inhibition optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur l'architecture des états de vigilance.....	149
3.2.2 Effet de l'inhibition optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur les caractéristiques du LFP et de l'EEG	150
Discussion	154
1. Considérations méthodologiques	154
1.1 AAV et modalité d'injection	154
1.2 Fibres optiques utilisées et procédure chirurgicale d'implantation	155
1.3 Stimulations lumineuses.....	156
2. Interprétation des résultats	158
2.1 Effet de la stimulation optogénétique sur les états de vigilance.....	158
2.2 Effet de la stimulation optogénétique sur les caractéristiques de l'LFP et de l'EEG	159
2.3 Effet de la stimulation optogénétique sur l'expression de FOS	160

DISCUSSION GENERALE	162
1. Résumé des principaux résultats obtenus	162
1.1 Les neurones corticaux qui sont modifiés au cours du SP	162
1.2 La nature neurochimique des neurones SP-on du Sum	163
1.3 Le rôle pendant le SP de la projection du Sum sur le GD	163
2. Considérations méthodologiques	164
2.1 Immunohistochimie.....	164
2.2 Utilisation de FOS comme marqueur d'activation cellulaire indirect	164
2.3 Privation de SP	166
2.1 Optogénétique	166
3. Interprétation des résultats	167
3.1 Etude 1. Le GD comme structure centrale d'activation au cours du SP.....	167
3.2 Etude 2. Nature de la voie SumL-dGD pendant le SP.....	168
3.3 Etude 3. Rôle du Sum dans l'activation du dGD au cours du SP	169
3.4 Le Sum comme modulateur du GD.....	170
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	172
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175

ABBREVIATIONS

3V	troisième ventricule
AAV	vecteur viral adéno-associé modifié
AC	commissure antérieure
ACA	cortex cingulé antérieur
Ach	acétylcholine
AH	aire hypothalamique antérieure
AM	aire hypothalamique médiane
Amyg	Amygdale
APC	cortex piriform antérieur
ARC	activity-regulated cytoskeletal-associated protein
Arch	archeorhodopsine
AUD	cortex auditif
AV	noyau thalamique ventral
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CA	corne d'Ammon
CA1, CA2, CA3	champs ammoniques 1,2, 3
CA1sr	stratum radiatum de CA1
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
Cb	Calbindine
CCK	cholécystokinine
Ce	cervelet
Cg	cortex cingulaire
CG	substance grise périaqueducule
CgCx	cortex cingulaire
ChR2	channelrhodopsine-2
ChRS	channelrhodopsines
Cl ou CLA	claustrum
CM	noyau thalamique médian
Cox2	cyclooxygenase 2

CP	caudate putamen
cp:	cerebral peduncle
CREB	cAMP response element-binding protein
CTb	subunité de la toxine cholérique B
DBB	bande diagonale de Broca
dGD	gyrus dentelé dorsal
DGgl	couche granulaire du gyrus dentelé
DG-h	hilus du gyrus dentelé
DGIP	couche l'infrapyramidale du gyrus dentelé
DGlb	couche latérale du gyrus dentelé
DGlb-mo	couche moléculaire latérale du gyrus dentelé
DGlb-sg	couche granulaire latérale du gyrus dentelé
DGmb	couche médiale du gyrus dentelé
DGmb-mo	couche moléculaire médiale du gyrus dentelé
DGmb-sg	couche granulaire médiale du gyrus dentelé
DGSP	couche suprapyramidale du gyrus dentelé
DH	aire hypothalamique dorsale
DP	cortex pédonculaire dorsal
DR	noyau raphé dorsal
DREADD	designers receptors excited by designer drugs
EC	cortex entorhinal
Hip	Hippocampe
ECT	area entorhinale
EEG	Electroencéphalogramme
EMG	Electromyogramme
eNpHR3.0	forme évoluée de NpHR
ENTl	area entorhinale latérale
EOG	électrooculogramme
EV	éveil
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
f	Fornix
FG	fluorogold
G	couche granulaire du gyrus dentelé

GAD65	glutamate décarboxylase 65
GC	cellules granulaires
GD	gyrus dentelé
H	hile du gyrus dentelé
IL	cortex infralimbique
IP	noyau interpédonculaire
L6	corde spinale, lamina 6
LC	locus coeruleus
LDT	noyau tegmental latérodorsal
LEC	cortex entorhinal latéral
LFP	potentiel de champs local
LH	hypothalamus latéral
LHb	habénula latérale
LM	noyau mammillaire latéral
LS	noyau septal latéral
LTP	hippocampal long-term potentiation
M	couche moléculaire du gyrus dentelé
MB	corps mamillaire
MBN	noyau basal magnocellulaire
MCH	melanin concentrating hormone
MCPO	noyau préoptique magnocellulaire
MD	noyau thalamique médio-dorsal
MEC	cortex entorhinal médian
mHb	median habenular nuclues
MM	noyau mammillaire médial, partie médiale
MnM	noyau mammillaire médial, partie médiane
MR	noyau du raphé médian
MS	septum médian
NpHR	Halorhodopsine
PAG	periaqueductal gray
PAR	parasubiculum
pCREB	phospho-cAMP response element-binding protein
PH	hypothalamus postérieur

PL	cortex prelimbique
PLH	partie pédunculaire de l'hypothalamus latéral
pm	principal mammillary tract
PM	noyau prémamillaire
pMAPK	phospho-mitogen-activated protein kinase
PMCo	area corticale posteromédiale
PO	noyau préoptique
POST	postsubiculum
PPC	cortex piriform postérieur
PPT	noyau tegmental pedunculo pontin
PRE	presubiculum
PSC	rats témoins
PSD	rats ayant subi une privation de SP
PSR	rats ayant subi une privation de SP suivie par un rebond de SP
Re	noyau reuniens
Rel	reelin
REM	rapid eye movement
RSC	rats témoins
RSD	rats ayant subi une privation de SP
RSP	rats ayant subi une privation de SP
RSP	cortex rétrosplénial
RSR	rats ayant subi une privation de SP suivie par un rebond de SP
shRNA	short hairpin RNA
SI	substance innommée
SL	sommeil lent
SLD	noyau sublatérodorsal
SP	sommeil paradoxal
SUB	subiculum
Sum	noyau supramammillaire
SumL	noyau supramammillaire latéral
SumM	noyau supramammillaire médian

TEA	temporal association areas
TRAP	targeted recombination in active populations
TT	tenia tecta
V3	troisième ventricule
vGAT	transporteur vésiculaire du GABA
vGD	gyrus dentelé ventral
vGLUT2	transporteur vésiculaire 2 du glutamate
VIP	peptide vasoactive intestinal
VIS	cortex visuel
VTA	aire tegmentale ventrale
W	Eveil
Zif268	zinc finger protein 225

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Le cycle veille-sommeil

La rythmicité est une des propriétés fondamentales de la matière vivante. Toutes nos activités métaboliques, physiologiques et psychologiques ont des rythmes; ces activités présentent des cycles de 24 heures. Un de ces rythmes est le cycle veille-sommeil caractérisé par le passage d'un état actif, durant lequel l'animal interagit avec l'environnement, à une phase d'inactivité ou sommeil.

Chaque état de vigilance correspond à une activité neuronale spécifique, mais aussi à des signes neurovégétatifs et des comportements spécifiques. L'identification des états de vigilance se fait à partir de critères prenant en compte au moins trois paramètres:

- l'électroencéphalogramme (EEG), découvert dans les années 20s par Hans Berger (Berger, 1929) consiste à enregistrer les différences de potentiel électrique entre deux électrodes placées sur le scalp. Ces différences de potentiel reflètent l'activité électrique du cerveau, qui se modifie progressivement selon l'état, et se manifeste sur l'EEG par des ondes cérébrales spécifiques de l'état de vigilance. Chez l'animal, il y a la possibilité de placer les électrodes EEG en contact direct avec la surface du cerveau, ou même intra-cérébralement (enregistrement de potentiel de champ local ou LFP);
- l'électrooculogramme (EOG) est obtenu à l'aide d'électrodes placées en contact avec les muscles oculaires pour enregistrer les manifestations électriques liées aux mouvements des yeux;
- l'électromyogramme (EMG) est obtenu avec des électrodes placées sur ou dans un muscle, classiquement les muscles de la nuque chez l'animal, et il permet d'enregistrer le tonus musculaire.

D'autres paramètres utilisés pour étudier les états de vigilance sont l'érection pénienne, les rythmes cardiaque et respiratoire et la température corporelle.

L'ensemble de ces mesures forme ce qu'on appelle communément les enregistrements polysomnographiques. Sur la base de ces mesures, chez les homéothermes trois états de vigilance ont été différenciés: l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal (**Figure 1**).

Le modèle animal historique pour l'étude du cycle veille-sommeil est le chat. Ce modèle a été ensuite progressivement remplacé par les rongeurs, pour des raisons autant financières que techniques (possibilité d'utilisation des techniques de biologie moléculaire, transgénèse, séquençage, etc.). Pour cette raison, et puisque cette étude est réalisée chez le rat et la souris, nous décrirons principalement le cycle veille-sommeil de ces animaux.

1.1 L'éveil (EV)

L'éveil est un état actif: l'animal a les yeux ouverts et interagit avec son environnement pour explorer, s'alimenter, se déplacer, se reproduire etc.

L'EEG est caractérisé par une activité électrique corticale rapide et désynchronisée, avec des ondes de faible amplitude de type beta (20-30 Hz), gamma (50-60 Hz) et thêta (6-12 Hz). La fréquence du rythme thêta peut varier de 5.5-6 Hz, quand l'animal est en éveil calme, à 7-8 Hz quand il est en éveil actif (Vyazovskiy et Tobler, 2005).

L'EMG est caractérisé par un tonus musculaire soutenu, avec une composante phasique qui est enregistré lorsque l'animal bouge et contracte les muscles enregistrés.

L'EOG montre une activité importante. Les fréquences cardiaque et respiratoire sont élevées et varient en fonction de l'activité de l'animal; la température corporelle est stable au tour de 38°C.

1.2 Le sommeil lent (SL)

Le sommeil lent est un état d'inactivité: l'animal a les yeux fermés et est peu réceptif aux stimuli de l'environnement. Il adopte une position en boule caractéristique, replié sur lui-même.

L'EEG est caractérisé par une activité électrique corticale synchronisée, avec des ondes de grande amplitude et de basse fréquence de type delta (0.5-5 Hz), et des fuseaux (spindles) de type sigma (12-14 Hz). La puissance des ondes delta, aussi appelé «Slow Wave» est un marqueur de l'homéostasie du sommeil puisque l'amplitude de ces ondes lentes dépend de l'intensité et de la durée de l'éveil précédent le sommeil (Tobler et Borbely, 1986; Vyazovskiy et al., 2007). L'EMG est caractérisé par un faible tonus musculaire et l'absence d'activité phasique. L'EOG ne montre aucune activité. Les fréquences cardiaque et respiratoire sont ralenties et régulières, la température corporelle est diminuée.

1.3 Le sommeil paradoxal (SP)

Pendant cet état l'animal a les yeux fermés et il a un seuil de réveil encore plus élevé qu'en sommeil lent.

L'EEG est caractérisé par une activité électrique corticale rapide et désynchronisée, avec des ondes de faible amplitude de type thêta (6-12 Hz) et gamma (30-40 Hz). Chez le chat sont présentes également des pointes PGO, des ondes électriques phasiques prenant naissance au niveau du pont et se propageant jusqu'au cortex occipital via le corps genouillé. Comme l'activité thêta, les pointes PGO pourraient jouer un rôle dans la plasticité synaptique dans les régions où elles sont présentes (Rasch et Born, 2013).

L'EMG est plat, indiquant une absence du tonus dans la musculature squelettique. Cette association entre un relâchement musculaire complet et une activité cérébrale intense, proche de celle de l'éveil, a été à l'origine de la dénomination en sommeil paradoxal (Jouvet et Michel, 1959; Jouvet et al., 1959).

L'atonie posturale peut être interrompue par des petits et brefs mouvements des extrémités des membres et de la face (twitches). Des érections pénienues surviennent aussi pendant ce stade sans corrélation temporelle avec les autres phénomènes phasiques (Schmidt, 2014).

L'EOG indique la présence d'une activité oculomotrice rapide, parfois synchronisée aux secousses musculaires. L'identification des mouvements oculaires rapides pendant le SP lui a également valu la dénomination de « Rapid Eye Movement sleep » (REM sleep, Aserinsky et Kleitman, 1953).

Pendant le SP, les fréquences cardiaque et respiratoire sont ralenties et irrégulières, et la température corporelle diminue à l'inverse de la température cérébrale qui augmente.

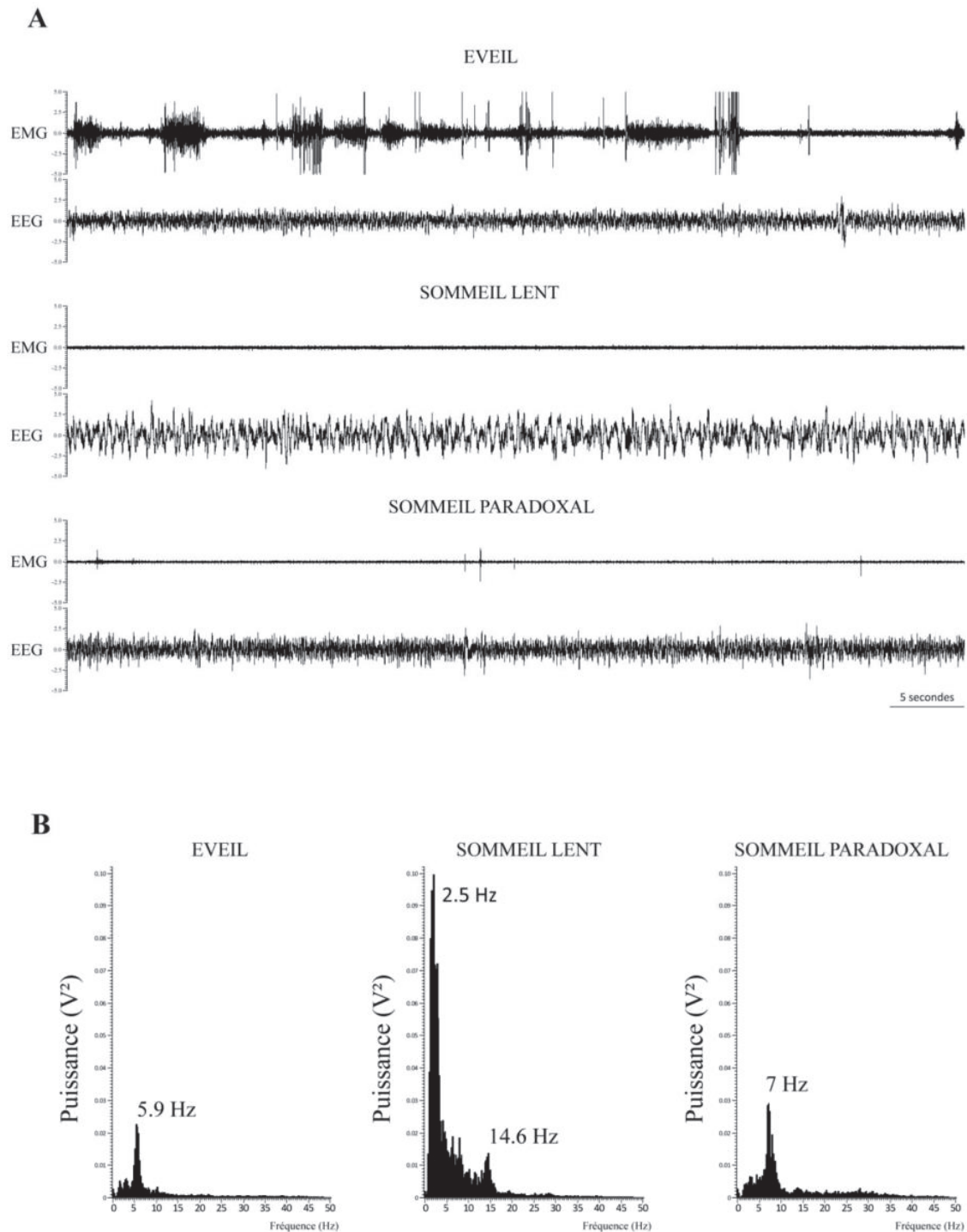


Figure 1. Caractérisation polygraphique des états de vigilance chez le rat.

- (A) Tracés électromyographique (EMG) et électroencéphalographique (EEG) enregistrés chez le rat durant l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. L'EEG a été enregistré au niveau du cortex pariétal.
- (B) Caractérisation de la composition spectrale de l'EEG de l'éveil, du sommeil lent et du sommeil paradoxal, au niveau du cortex pariétal à l'aide d'un spectre de puissance.

1.4 L'organisation du cycle veille-sommeil chez le rongeur

Chez le rongeur le cycle veille-sommeil est dit ultradien parce qu'il se présente avec une fréquence supérieure au rythme circadien (fréquence pluriquotidienne). Pendant la phase diurne (qui correspond à la période de repos) un épisode de SP apparaît environ toutes les 10 minutes et dure en moyenne deux minutes chez le rat, 40 secondes chez la souris. Le pourcentage total de SP représente 10%, alors que le SL et l'EV constituent respectivement 60% et 30% du temps total. Pendant la phase nocturne (période active) les trois états constituent respectivement 4%, 35% et 60% du temps total.

Au cours de ces cycles, l'alternance entre les trois états de vigilance se fait de manière ordonnée: le SP n'apparaît jamais après une période d'EV, mais toujours après une phase de SL. De plus, il est toujours suivi d'une période de microéveil ou d'EV.

1.5 Les fonctions du SP

Il a été montré que la privation expérimentale de SP est létale en 15-20 jours chez le rat (Rechtschaffen et Bergmann, 2002). Par ailleurs, une augmentation des quantités de SP est observée après privation de SP: c'est le phénomène de «rebond de SP» (Jouvet et al., 1964; Jouvet, 1965). Le rebond, lors de la récupération est d'autant plus important que la privation a été longue. Lors du rebond, la durée et le nombre des phases de SP augmentent, l'intervalle entre les différentes phases diminue, les activités phasiques sont très fortement accrues et les seuils d'éveil sont plus élevés.

Ces faits mettent en évidence la spécificité de besoin de SP et suggèrent nettement un rôle fonctionnel important de ce stade de sommeil (Rechtschaffen et Bergmann, 2002; Hennevin et Leconte, 1971). Cependant, la fonction du SP est toujours inconnue plus de 50 ans après sa découverte. Je fais le point ci-dessous sur les différentes hypothèses qui ont été avancées.

1.5.1 Le SP et le rêve

Le SP est considéré comme le substrat biologique du rêve. Lorsque l'on réveille un sujet au cours d'une phase de SP, 8 fois sur 10, il affirme qu'il était en train de rêver; en revanche, si

le sujet est réveillé au cours d'un épisode de SL, il rapporte un rêve seulement dans 7% des cas (Dement et Kleitman, 1957). Par ailleurs, il semble y avoir une corrélation entre la direction des mouvements oculaires rapides au cours du SP et la nature du rêve rapporté: un sujet qui, par exemple, rêve de la pluie qui tombe, présente des mouvements oculaires verticaux. L'intensité et la vivacité du rêve sont donc liés à l'intensité des mouvements oculaires rapides pendant le SP (Hennevin et Leconte, 1971; Sandor et al., 2014).

Il existe plusieurs théories sur le rôle des rêves: selon Freud, le rêve est "la voie royale de l'inconscient". Autrement dit, les rêves sont la manifestation des pulsions, des désirs qu'on n'exprime pas dans la réalité. Tous nos rêves comporteraient des messages standards, liés au célèbre complexe d'Œdipe et au désir sexuel refoulés pendant notre enfance. Chez l'animal, cette théorie de l'inconscient ne peut pas encore être prouvée. En revanche des nombreuses études ont été réalisées sur le chat, en particulier des lésions du noyau sublatérodorsal dans le pont, qui abolissent l'atonie musculaire liée au SP. Les chats lésés ont des comportements d'exploration, d'attaque ou de fuite, et jamais d'activités sexuelles. Ces observations ont fait naître la théorie selon laquelle le SP servirait à l'expression périodique des comportements instinctifs et nécessaires à la survie, permettant ainsi leur conservation pendant toute la vie de l'individu (Jouvet, 1979).

1.5.2 Le SP et la maturation cérébrale

Le SP semble jouer un rôle essentiel dans la maturation nerveuse. Il fournirait une stimulation endogène nécessaire à la différenciation structurale et à la maturation du système nerveux central au cours de la vie fœtale et postnatale, c'est à dire au moment où la croissance du cerveau est maximale. Le taux de SP est très élevé dans les premiers jours de la vie et diminue avec la maturation du cerveau et l'achèvement du processus de myélinisation. A partir du moment où le système nerveux reçoit davantage de stimulations pendant l'EV, il y aurait une demande réduite en SP, celui-ci ayant rempli ses fonctions primitives essentielles et l'EV prenant le relais (Roffwarg et al., 1966; Jouvet, 1980; Hennevin and Leconte, 1971). Une étude comparative du cobaye, du rat et du chat nouveaux nés met en relief la relation existant entre le degré de maturité nerveuse à la naissance et le taux de SP (Jouvet-Mounier et al., 1970): le cobaye est presque mature lorsqu'il naît, son pourcentage de SP par rapport au sommeil total n'est que de 15%; en revanche, le chaton très immature passe 90% de son sommeil en SP; chez le raton, plus immature encore à la naissance que le chaton, le seul sommeil décelable est le SP (100%). Devenu adulte il ne présentera plus que 15% de SP par rapport au sommeil total. Chez l'homme, les nouveaux nés présentent après la naissance 50 à

60% de SP. Ainsi le SP semble clairement impliqué dans le développement du système nerveux des mammifères (Maquet et Franck, 1997; Hobson et Pace-Schott, 2002; Blumberg et al., 2014).

1.5.3 Le SP et la neurogenèse

Chez les mammifères adultes, la neurogenèse est limitée au bulbe olfactif, à la zone sous-ventriculaire et à la couche sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe (Gross, 2000). Il a été fait l'hypothèse que le SP optimiserait la neurogenèse chez l'adulte en régulant la prolifération, la migration et la différenciation des neurones néoformés. Il a été montré qu'une privation sélective de SP entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules exprimant le phénotype neuronal dans l'hippocampe des rats adultes. La même réduction a été observée après privation totale de sommeil; ça serait donc le SP et pas le SL qui aurait une influence sur la neurogenèse chez l'animal adulte (Guzman-Marin et al., 2005, 2008).

1.5.4 Le SP et la mémoire

L'importance du sommeil dans la consolidation de la mémoire est maintenant un fait bien admis. Si pendant de nombreuses années il était considéré que le sommeil favorisait la mémoire d'une manière passive en réduisant les interférences extérieures, la communauté scientifique lui donne maintenant un rôle clairement actif dans la consolidation mnésique.

De nombreuses études ont eu comme objectif de mettre en évidence comment le sommeil contribue à la stabilité et à la persistance de la mémoire dans toutes ses formes. Ainsi il a été montré chez l'animal que les quantités de SP sont augmentées pendant la nuit suivant une variété de tâches d'apprentissages ou une exposition à un environnement enrichi (Rasch et Born, 2013; Smith, 1995) alors que les capacités de mémorisation sont altérées après une privation de SP (Smith, 1996). En particulier, il a été observé chez le rat que les 4 premières heures de SP suivant un apprentissage sont essentielles pour la consolidation mnésique (Smith and Rose, 1996; Graves et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré que la densité des fuseaux au cours du SL augmente après une tâche de discrimination olfactive (Eschenko et al., 2006) et cette modification du SL n'est pas présente quand l'animal n'apprend pas la tâche (Eschenko et al., 2008) suggérant un effet cognitif de cette modification de l'architecture du SL sur la mémoire. SP et le SL semblent donc jouer des rôles distincts dans la consolidation de différentes formes de mémoires.

D'autre part, chez l'animal le SP semble être impliqué dans les mémoires dépendantes de l'hippocampe (Prince et Abel, 2013). L'apprentissage spatial dans le labyrinthe aquatique de Morris se déroule en deux étapes : la première phase («visible») consiste à apprendre à monter sur une plateforme, cela ne dépend pas de l'hippocampe; dans la deuxième phase («spatiale») l'animal doit utiliser des repères contextuels et spatiaux pour localiser une plateforme cachée submergée dans l'eau opaque, cette étape dépend de l'hippocampe. Il a été montré que seules les performances dans la version spatiale de la tâche sont altérées par une privation de SP post-apprentissage (Smith et Rose, 1996, 1997). De la même manière, la privation de SP provoque une diminution de la rétention dans une tâche de conditionnement contextuel à la peur, dépendante de l'hippocampe mais pas lors d'une tâche de conditionnement à la peur auditif (ou indicé) qui ne dépend pas de l'hippocampe (McDermott et al., 2003; Ruskin et al., 2004). Ainsi, le sommeil contribue de manière active aux processus de consolidation mnésique et de manière différente selon le type de mémoire, mais quels mécanismes sont mis en jeu?

Lors d'un apprentissage, les mécanismes de plasticité requis pour la formation de traces mnésiques aboutissent à un remodelage des réseaux neuronaux impliquant l'insertion de nouveaux récepteurs, la conversion de synapses silencieuses en synapses actives et la formation de nouvelles synapses (Jones et al., 2001).

Une des principales hypothèses avancées actuellement pour expliquer les phénomènes de consolidation mnésique pendant le sommeil est celle de la consolidation systémique active. Selon cette hypothèse, pendant l'état d'EV les différents aspects d'un vécu seraient encodés dans le réseau cortical, en particulier dans l'hippocampe; pendant le SL ces traces mnésiques seraient réactivées de façon répétée et ainsi redistribuées aux sites neocorticaux de stockage à long terme. Les réactivations répétées des traces mnésiques pendant le sommeil permettraient ainsi leur stabilisation via des mécanismes cellulaires (consolidation synaptique) et leur intégration dans les réseaux de la mémoire via leur transfert progressif vers le néocortex (consolidation systémique). Cette réactivation de nouvelles mémoires pendant le SL permettrait de solliciter le réseau cortical pertinent afin que la consolidation synaptique puisse avoir lieu pendant le SP (Diekelmann et Born, 2010; Rasch et Born, 2013; Buzsaki, 1998).

La réactivation des traces mnésiques pendant le sommeil a été observée dans les cellules de lieu du rat. Quand l'animal est en comportement exploratoire, ces cellules hippocampiques déchargent de façon spatio-temporelle afin d'élaborer une représentation mnésique de l'environnement (Wilson et McNaughton, 1993). Ce type d'activité est rejoué par les mêmes populations de neurones de la région CA1 aux cours des phases de SL et SP qui suivent

(Wilson et McNoughton, 1994; Louie et Wilson, 2001). De même, les cellules granulaires du gyrus dentelé montrent une réactivation pendant le sommeil qui suit un apprentissage spatial. Les cellules activées pendant l'apprentissage se réactivent au cours du sommeil qui suit, alors que les neurones qui ne sont pas actifs pendant l'apprentissage restent silencieux au cours du sommeil. Cet effet de réactivation est très présent dans les 10 premières minutes de sommeil post-apprentissage, et se réduit pendant les 20 minutes suivantes (Shen et al., 1998).

Chez l'homme, ce processus de réactivation a été également décrit par imagerie cérébrale au cours du SP. Il a été montré que les aires cérébrales activées lors d'un apprentissage procédural se réactivent lors de la phase de SP qui suit (Maquet et al., 2000).

Mécanismes de la formation de la mémoire dépendante du SP

Des études d'expression génique montrent une augmentation d'expression de gènes et protéines liés à la plasticité spécifiquement pendant le SP prenant place suite à un apprentissage (Datta et al., 2008; Saha et Datta, 2005). La consolidation d'une réponse d'évitement actif pendant le SP induit une augmentation de l'expression des gènes liés à la plasticité dans les régions limbiques, particulièrement dans l'hippocampe dorsal. L'apprentissage d'une tâche d'évitement actif chez le rat induit une augmentation de la phosphorylation de CREB (cAMP, response element-binding protein), de l'expression de la protéine ARC (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) ainsi que de l'expression des ARNm d'ARC, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et Zif268 (zinc finger protein 225) dans l'hippocampe dorsal et l'amygdale au cours des 3 heures de sommeil post-apprentissage (Datta et al., 2008). De plus, des études anatomo-fonctionnelles récentes montrent la présence d'un nombre considérable de neurones activés (immunoréactifs au FOS) dans certaines aires hippocampiques après hypersomnie de SP, ce qui suggère que des changements à long terme prennent place dans les neurones corticaux au cours du SP (Ravassard et al., 2009; Sastre et al., 2000; Renouard et al., 2015). D'autres facteurs (BDNF, MAPK, ERK) qui sous-tendent la consolidation et la reconsolidation des informations mnésiques augmentent aussi leur expression dans l'hippocampe après hypersomnie de SP (Kelly et al., 2003; Ravassard et al., 2009; Renouard et al., 2015).

Par ailleurs, l'expression de Zif268 est induite dans l'hippocampe au cours d'un épisode de SP prenant place 30 minutes après l'exposition à un nouvel environnement (Ribeiro et al., 1999), ou après l'application in vivo d'une stimulation électrique de haute fréquence dans le gyrus dentelé (Ribeiro et al., 2002). L'expression de Zif268 se propage au cours des épisodes de SP sélectivement dans le cortex entorhinal pour gagner ensuite les aires néocorticales.

Pendant le SP, les ondes thêta ont une cohérence réduite entre les circuits limbiques hippocampiques et thalamo-corticaux par rapport à l'EV et au SL, indiquant une diminution de la communication entre ces structures (Montgomery et al., 2008; Cantero et al., 2003; Axmacher et al., 2008). En résumé, ces résultats suggèrent que les mémoires initialement labiles et dépendantes de l'hippocampe pourraient être graduellement transférées pendant le SP aux aires néocorticales et deviendraient ainsi plus stables (Ellebongen et al., 2006; Drosopoulos et al., 2007; Korman et al., 2007; Walker, 2009; Rasch and Born, 2013; Ribeiro and Nicolelis, 2004).

Toutes ces études ont permis d'apporter quelques réponses sur les mécanismes responsables de la consolidation de la mémoire prenant place au cours du SP. Une autre démarche a été poursuivie au sein du laboratoire. Pendant de nombreuses années, les études du laboratoire ont porté sur l'identification des régions sous-corticales responsables de la genèse du SP (Verret et al., 2003, 2005). La dernière étude publiée à laquelle j'ai contribué au cours de ma thèse se focalise sur l'identification des populations de neurones corticaux activés au cours du SP (Renouard et al., 2015). Cette étude a mis en évidence qu'un nombre restreint de structures limbiques contiennent des neurones activés au cours du SP. Mon travail se situe dans le prolongement de cette étude.

2. L'activation des régions limbiques au cours du SP et de l'EV

Un certain nombre d'études indiquent que l'activation corticale pendant le SP est proche mais n'est pas identique à celle de l'EV. En effet, l'EEG cortical est composé d'ondes thêta et gamma au cours de l'EV et du SP, et le métabolisme cortical est similaire pendant ces deux états. De plus, les concentrations d'acétylcholine et de glutamate augmentent de façon similaire en EV et SP dans le cortex par rapport au SL (Dash et al., 2009). En revanche, excepté pour la concentration de la dopamine stable au cours des trois états, les concentrations des monoamines (sérotonine, noradrénaline et histamine) élevées en EV diminuent au cours du SL et plus encore du SP (Rasch et Born, 2013).

Par ailleurs, des études d'imagerie cérébrale chez l'homme montrent que plusieurs structures ont une activité supérieure au cours du SP par rapport à l'EV: le tegmentum pontique, le thalamus, le télencéphale basal, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal médian, le cortex cingulé antérieur et les aires temporo-occipitales (Maquet et al., 2005; Ioannides et al., 2009).

Selon l'hypothèse courante, l'activation corticale pendant l'EV dépend des projections sérotoninergiques du raphé dorsal (DR), noradrénergiques du locus coeruleus (LC), histaminergiques et orexinergiques de l'hypothalamus postérieur et cholinergiques du tegmentum ponto-mesencéphalique et du télencéphale basal. L'activation corticale pendant le SP serait due aux neurones cholinergiques du noyau latérodorsal (LDT) et pedunculo-pontin (PPT) du tegmentum ponto-mesencéphalique et aux neurones glutamatergiques du noyau sublatérodorsal (SLD) de la formation réticulée qui projettent au noyau thalamique intralaminaire ou au télencéphale basal (Brown et al., 2012, Lee and Dan, 2012).

Ainsi, le niveau d'activation corticale n'est pas strictement identique au cours de l'EV et du SP, cependant il restait encore à identifier les populations de neurones corticaux et les mécanismes sous-corticaux responsables de cette activation.

Pour répondre à cette question, une étude récente du laboratoire a comparé l'expression génique dans le néocortex et l'hippocampe chez trois groupes de rats: privés de SP, rendus hypersomniaques en SP et témoins. Cette étude a montré que pendant une hypersomnie de SP l'expression de BDNF est augmentée dans l'hippocampe et le néocortex par rapport aux autres conditions (Renouard et al., 2015). Ce gène est un marqueur connu de plasticité et d'activation neuronale (Bramham et Messaoudi, 2005).

Par ailleurs, l'expression de la protéine FOS qui est un marqueur d'activité, est augmentée dans certaines structures limbiques pendant l'hypersomnie de SP par rapport aux conditions témoins et de privation de SP. Ces régions sont le gyrus dentelé de l'hippocampe (GD) (**Figure 2 A-B**), les cortex rétrosplénial, amygdalien et entorhinal médian et le claustrum. De plus, l'expression de la protéine COX2 qui est impliqué dans la plasticité (Kaufmann et al., 1996) est augmentée dans le GD chez les rats hypersomniaques par rapport aux autres animaux (**Figure 2 C-D**). Dans le néocortex, l'expression de FOS est augmentée pendant la privation de SP par rapport aux autres conditions dans les cortex moteur, auditif, somatosensoriel, visuel et piriforme. Dans le cortex cingulé antérieur, l'expression de FOS est augmenté à la fois pendant la privation et l'hypersomnie de SP par rapport à la condition témoin.

L'expression de FOS a été aussi analysée dans un groupe de rats restés réveillés pendant 3 heures. Durant cette condition d'EV, presque toutes les structures corticales et hippocampiques montrent une augmentation de l'expression de FOS par rapport aux autres conditions. Le GD est la seule structure corticale qui contient plus de neurones FOS+ pendant l'hypersomnie de SP par rapport à cette condition d'EV (**Figure 2E**). Ces résultats suggèrent que l'activation corticale pendant le SP est limitée à quelques structures limbiques: le GD de l'hippocampe, les cortex rétrosplénial, entorhinal médian, amygdalien et cingulé antérieur (Renouard et al., 2015). Le GD est la seule structure qui montre une activation plus importante en SP qu'en EV suggérant que cette structure joue un rôle crucial au cours du SP.

Pour identifier les voies responsables de l'activation de ces structures corticales pendant le SP, des traceurs rétrogrades ont été éjectés dans le GD, le cortex rétrosplénial et le cortex cingulé antérieur chez des rats rendus hypersomniaques en SP. Les résultats montrent que parmi les régions afférentes au GD, seule la partie latérale du noyau supramammillaire (SumL) de l'hypothalamus postérieur contient des neurones rétrogradement marqués et positifs pour FOS. En revanche, après éjection d'un traceur rétrograde dans le cortex rétrosplénial ou cingulé antérieur, des neurones doublement marqués ont été observés principalement dans le claustrum et en minorité dans le SumL. Ces résultats suggèrent que

pendant le SP l'activation des cortex rétrospécial et cingulé antérieur dépend du claustrum, alors que celle du GD dépend du Sum (Renouard et al., 2015). Par ailleurs, la lésion du Sum chez le rat induit une réduction de la puissance du thêta, une augmentation de la puissance du sigma dans l'EEG et une forte réduction du nombre de neurones FOS+ dans le GD pendant l'hypersomnie de SP (**Figure 2F**; Renouard et al., 2015).

Par cette approche de neuroanatomie fonctionnelle il a été ainsi montré que l'activation corticale pendant le SP n'est pas généralisée mais limitée à quelques structures limbiques déterminantes pour l'apprentissage et la mémoire: le GD, les cortex rétrospécial, entorhinal médian, amygdalien et cingulé antérieur. Par ailleurs, le SumL semble être une structure clef pour l'activation du GD au cours du SP, alors que le claustrum pourrait jouer un rôle important dans l'activation des cortex cingulé antérieur et rétrospécial. Ces régions limbiques sont impliquées dans de nombreux processus cognitifs comme le traitement des émotions et la mémoire (Goll et al., 2015; Bush et al., 2000; Robinson et al., 2012; Niu et al., 2012; Suh et al., 2011; Kheirbek et al., 2013; Silveira et al., 1993), ce qui soutient fortement l'implication du SP dans les processus cognitifs.

Dans la partie suivante, je détaille les caractéristiques anatomiques et physiologiques de ces aires limbiques actives au cours du SP.

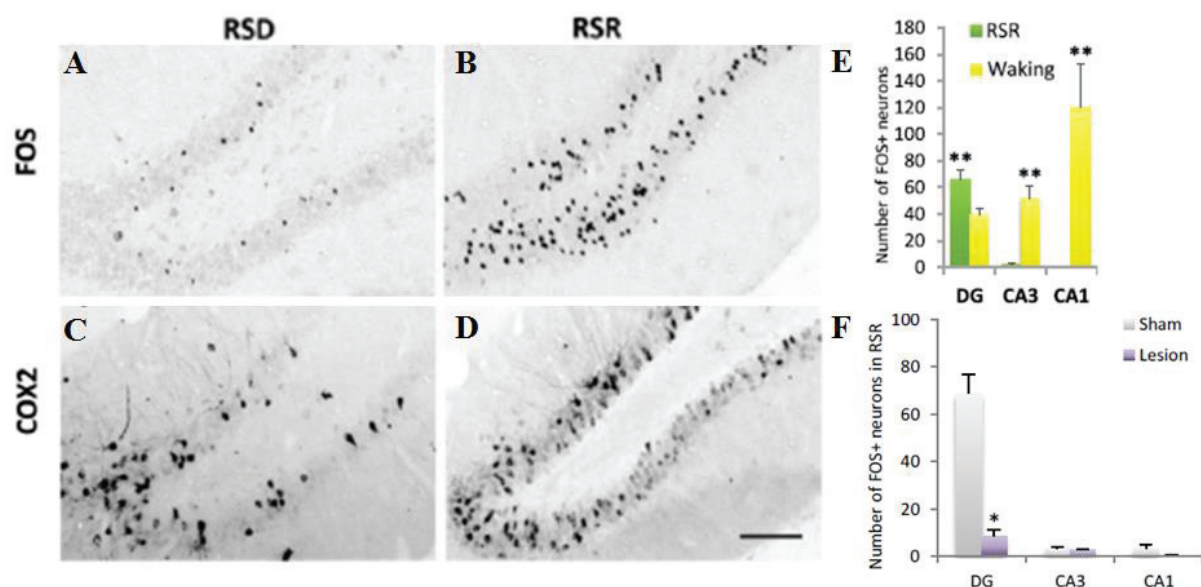


Figure 2. L'expression des IEG augmente dans les cellules granulaires du GD après hypersomnie de SP.

(A-B) Photos montrant l'expression des marqueurs FOS et COX2 (C-D) dans le GD de rats privés (RSD) et rebond (RSR).

(E) Nombre de neurones FOS+ dans l'hippocampe de rats hypersomniaques en SP (RSR), et éveillés (Waking).

(F) Nombre de neurones FOS+ dans l'hippocampe de rats RSR témoins et avec lésion du noyau supramammillaire (modifié de Renouard et al., 2015).

2.1 Le claustrum

Le claustrum est constitué d'une fine couche de neurones situés entre le cortex insulaire et le striatum. Cette structure établit des connexions avec la majorité des régions corticales: le cortex visuel, auditif, somatosensoriel, moteur, piriforme, préfrontale, entorhinal et le subiculum (Goll et al., 2015). 90% de neurones du claustrum sont de type glutamatergique (Rahman et Baizer, 2007). Ces neurones glutamatergiques projettent à la fois sur les cellules pyramidales et les interneurons inhibiteurs du cortex (Goll et al., 2015). En effet, l'action du claustrum sur les interneurons inhibiteurs pourrait expliquer la réduction de la décharge neuronale observée dans le cortex moteur après stimulation électrique du claustrum chez le chat (Salerno et al., 1984).

D'un point de vue fonctionnel, vu le grand nombre de connexions corticales que cette structure établit, il a été proposé qu'elle puisse agir comme un nœud central du réseau cortical, en coordonnant les activités des circuits corticaux. En effet, des études de neuroanatomie ont montré que le claustrum pourrait être impliqué dans la régulation des mouvements de vibrisses chez le rat, en particulier dans la coordination entre hémisphères du cortex moteur et somatosensoriel: suite à l'injection de traceurs antérogrades et rétrogrades dans ces cortex il a été montré que le cortex moteur projette plus au claustrum controlatéral qu'ipsilatéral, alors que le cortex somatosensoriel ne projette pas du tout au claustrum. En revanche, ces deux régions corticales reçoivent des projections en provenance du claustrum. (Smith et al., 2012). Il a aussi été proposé un rôle du claustrum dans l'attention, il agirait comme un «centre de tri» des informations en provenance du cortex préfrontal. Selon ce modèle, les projections de l'amygdale, du cortex entorhinal et de l'hippocampe sur le claustrum pourraient jouer un rôle dans la coordination des éléments spatiaux, sociaux et émotionnels dans le processus d'attention, alors que les projections du claustrum aux centres moteurs et oculomoteurs pourraient moduler la manifestation motrice de la réponse d'attention, par exemple à travers l'orientation du corps (Goll et al., 2015).

Ainsi, le claustrum pourrait agir comme un centre d'intégration des informations sensorielles et internes (Crick et Koch, 2005; Goll et al., 2015). Cependant, un rôle spécifique de cette région n'a pas encore été démontré.

2.2 Le cortex cingulé antérieur

Le cortex cingulé antérieur est la partie frontale du cortex cingulé, qui s'enroule autour du corps calleux. Cette région peut être divisée anatomiquement en une partie dorsale aux fonctions cognitives et une partie rostrale-ventrale aux fonctions émotionnelles (Bush et al., 2000). La partie dorsale établit des interconnexions fortes avec le cortex préfrontal latéral, le cortex pariétal et l'aire prémotrice, ce qui en fait une station centrale de traitement pour des stimuli ascendants et descendants et d'affectation de contrôle vers d'autres zones du cerveau. La partie ventrale est connectée à l'amygdale, à la substance grise périaqueducale, au noyau accumbens, à l'hypothalamus, à l'insula antérieure, à l'hippocampe et au cortex orbitofrontal. Le cortex cingulé antérieur est impliqué dans la cognition et les émotions, en particulier dans les stades précoces de l'apprentissage émotionnel. Le cortex cingulé antérieur pourrait codifier rapidement les informations en entrée, et les oublier rapidement pour en acquérir de plus récentes (Bush et al., 2000). En effet, chez l'homme et le lapin il a été montré que la lésion du cortex cingulé antérieur réduit l'acquisition précoce d'une tâche d'apprentissage émotionnelle (Cohen et al., 1999; Gabriel, 1990). Chez le rat, au contraire la lésion du cortex cingulé antérieur semble plutôt favoriser les stades précoces de l'apprentissage (Bussey et al., 1996). Ainsi, plus d'études doivent être réalisées pour bien comprendre le rôle de cette structure dans l'apprentissage émotionnel.

2.3 Le cortex rétrosplénial

Le cortex rétrosplénial est une des régions corticales la plus étendue du cerveau du rat (Vogt et Peters, 1981). Il établit de connections réciproques avec le cortex préfrontal, le thalamus et l'hippocampe (Vann et al., 2009). L'inhibition de la synthèse de protéines ou d'ARNm dans le cortex rétrosplénial induit une réduction des performances dans un test d'évitement (Katche et al., 2013). De plus, l'expression des marqueurs d'activité et plasticité FOS et ARC est augmentée dans le cortex rétrosplénial après exposition à un test de conditionnement à la peur contextuel (Robinson et al., 2012). Ces données suggèrent un rôle de cette région dans la consolidation de la mémoire émotionnelle.

Chez l'homme, l'altération du cortex rétrosplénial est associée à l'incapacité de s'orienter dans l'espace, à la fois nouveau et familier (Maguire, 2001). Chez le rat, il a été récemment démontré que la lésion du cortex rétrosplénial altère les performances spatiales (Nelson et al., 2015). Cependant, les mécanismes avec lesquels cette structure contrôle la mémoire sont encore largement inconnus.

2.4 Le cortex amygdalien

Le cortex amygdalien reçoit des afférences des aires olfactives, du cortex insulaire et du noyau parabrachial (Ottersen, 1982; Bernard et al., 1993) et projette préférentiellement à l'hypothalamus (Krettek and Price, 1978). Les neurones du cortex amygdalien sont en majorité glutamatergiques et en minorité GABAergiques (Oka et al., 2008; Poulin et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que les neurones glutamatergiques de cette région forment des synapses avec les neurones à MCH de l'hypothalamus latéral (Niu et al., 2012) et ainsi pourrait contrôler les comportements liés à la prise alimentaire et également jouer un rôle dans l'activation des neurones à MCH au cours du SP.

3. L'activation de la formation hippocampique pendant le SP et l'EV

La formation hippocampique comprend deux structures majeures: le subiculum et l'hippocampe.

3.1 Le subiculum

Le subiculum est la partie basse de la formation hippocampique située entre le cortex entorhinal et la région hippocampique CA1. C'est la voie principale de sortie de l'hippocampe. Il reçoit en effet des afférences de l'aire CA1, du cortex entorhinal et préfrontal et du thalamus. Il se projette sur le noyau accumbens, le cortex préfrontal, l'hypothalamus latéral, le noyau reuniens, le cortex entorhinal, les corps mammillaires (O' Mara, 2005). Récemment il a été montré l'existence de projections excitatrices et inhibitrices du subiculum aux cellules pyramidales et aux interneurons de la région CA1 (Sun et al., 2014).

Le subiculum avec le presubiculum et le parasubiculum, forment la région subiculaire.

3.2 L'hippocampe

L'hippocampe s'étend sur un axe septo-temporal: il débute au niveau septal, médian et dorsal dans chaque hémisphère, puis se courbe caudalement et latéralement en forme de C, et se termine au niveau temporal, latéral et ventral. Il est composé du gyrus dentelé (GD) et de la Corne d'Ammon qui est subdivisée en trois aires nommées CA1, CA2 et CA3 (Amaral et Witter, 1989).

Les différentes régions hippocampiques contiennent plusieurs types cellulaires :

- les neurones glutamatergiques, comprenant les cellules pyramidales des régions CA1, CA2 et CA3, les cellules granulaires du GD, les cellules géantes («giant cells») des régions CA1 et

CA3 (Gulyàs et al., 1998; Savic et Sciancalepore, 2001) et les cellules moussues du hile (Frotscher et al., 1991);

- les neurones GABAergiques, présentes dans toutes les couches de l'hippocampe.

3.2.1 Connexions intra-hippocampiques

Au niveau cellulaire, l'hippocampe est caractérisé par un circuit neuronal trisynaptique: les afférences de l'hippocampe (voir paragraphe 3.2.2) contactent directement les cellules granulaires contenues dans le GD. Celles-ci envoient massivement leurs axones (qui constituent les fibres moussues) vers les dendrites des cellules pyramidales de CA3 (Yeckel et Berger, 1990). Puis les axones des cellules pyramidales de la zone CA3 se projettent sur les dendrites des cellules pyramidales de la zone CA1 (voie appelée collatérale de Schaffer). Celles-ci émettent enfin leurs axones vers le subiculum et d'autres régions (voir paragraphe 3.2.3) complétant ce circuit tri-synaptique (**Figure 3**). En parallèle à cette boucle trisynaptique, il existe des connexions directes depuis CA3 vers CA2 et le subiculum (Amaral et Witter, 2004).

Une étude récente a aussi montré que les cellules pyramidales et les interneurons de la région CA1 reçoivent des afférences excitatrices et inhibitrices du subiculum (Sun et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la voie trisynaptique hippocampique pourrait opérer aussi d'une manière rétrograde, du subiculum aux aires CA1 et CA3 (Jackson et al., 2014).

L'hippocampe contient également des neurones dont l'axone peut s'étendre non seulement transversalement (dans un même niveau hippocampique, permettant une action locale) mais aussi longitudinalement, ce qui permet de contacter un nombre plus élevé de cellules (Houser, 2007). C'est le cas des «basket cells» du GD et des cellules moussues glutamatergiques du hile du GD qui assurent la communication entre les régions dorsales et ventrales du GD.

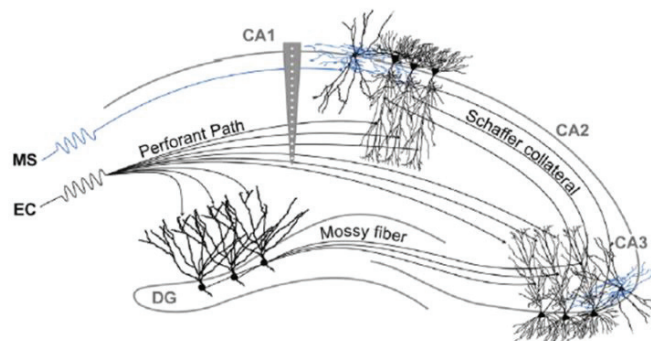


Figure 3. Circuit neuronal trisynaptique de l'hippocampe.

Le cortex entorhinal (EC) et le septum median (MS) contactent directement les cellules granulaires du gyrus dentelé (GD), qui envoient ses fibres moussues vers les cellules pyramidales de l'aire CA3. Puis les axones des

cellules pyramidales de la zone CA3 se projettent vers les cellules pyramidales de la zone CA1 via les collatérales de Schäffer (Pignatelli et al., 2012).

3.2.2 Afférences à l'hippocampe

La principale voie afférente à l'hippocampe est la voie perforante, qui provient du cortex entorhinal (Dolorfo et Amaral, 1998).

D'autres afférences proviennent des noyaux amygdaliens qui projettent sur les régions CA1, CA2 et CA3 (Pitkanen et al., 2000); et du septum médian dont les neurones cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques innervent les zones CA1, CA3 et les couches supragranulaire et moléculaire du GD.

Des neurones glutamatergiques du noyau réunis du thalamus innervent le subiculum et la région CA1 (Halasy et al., 2004).

Les noyaux du raphé dorsal et médial projettent sur les interneurons des régions CA1, CA3 et sur le hile du GD (Halasy et al., 1992). Les mêmes régions sont innervées aussi par le locus coeruleus.

En ce qui concerne les afférences de l'hypothalamus, elles proviennent du noyau supramammillaire (qui sera mieux décrit dans le chapitre 5) et du noyau tuberomammillaire, qui innerve tout l'hippocampe avec des projections histaminergiques (Köhler et al., 1985).

3.2.3 Efférences de l'hippocampe

Les cellules principales du subiculum et de la région CA1 innervent d'autres régions du système limbique comme le cortex préfrontal et entorhinal, l'amygdale, les corps mammillaires et le septum latéral (Pitkanen et al., 2000; Ishizuka, 2001; Yoshida et Oka, 1995).

De plus, les cellules pyramidales de la région CA3 projettent sur le septum latéral (Swanson et Cowan, 1977), alors que les cellules GABAergiques de CA1, CA3 et du hile du GD projettent sur le septum médian (Houser, 2007).

3.2.4 Activité hippocampique pendant le SP et l'EV

Les études de neuroimagerie chez l'homme indiquent une augmentation de l'activation hippocampique pendant le SP par rapport à l'EV (Maquet et al., 1996, 2000, 2005; Ioannides et al., 2009). De plus, l'hippocampe utilise 20% de glucose en plus en SP qu'en EV (Lydic et al., 1991).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux qui ont été obtenus chez le chat par la visualisation du marqueur d'activation FOS. En effet, chez des chats effectuant de grandes quantités de SP après injection de muscimol dans la substance grise périaqueducule, de nombreux neurones expriment la protéine FOS dans le GD, le Corne d'Ammon et le subiculum, alors que ces neurones sont très peu nombreux en EV (Sastre et al., 2000). Par ailleurs nous avons récemment montré chez le rat que la protéine FOS est plus fortement exprimée dans le GD pendant une hypersomnie de SP que pendant l'EV (Renouard et al., 2015).

Pendant le SP et l'EV, les concentrations d'acétylcholine, de dopamine et de cortisol sont élevées par rapport au SL. En revanche, les quantités de noradrénaline, d'histamine et de sérotonine sont faibles pendant le SP par rapport à l'EV (Born et Wagner, 2004; Rasch et Born, 2013). Il a été proposé que ce tonus en neurotransmetteurs pendant le SP entraîne la réduction d'efficacité de la transmission de la voie perforante au GD, de la voie du GD à la région CA3, de la région CA3 à la zone CA1 et de la région CA1 au subiculum. En revanche, il y aurait une augmentation de l'efficacité de la voie perforante aux régions CA3 et CA1 et une potentialisation des connections synaptiques dans la région CA3. Ce modèle pourrait expliquer les différences entre SP et EV dans le traitement des informations et les mécanismes de mémoire (Sil'kis, 2009).

Activité thêta hippocampique

L'enregistrement des régions hippocampiques montre la présence d'une activité dans la gamme d'onde thêta (6-12 Hz) prononcée au cours de l'EV exploratoire et du SP (Buszaki, 2002). A travers la boucle trisynaptique, les ondes thêta se propagent dans la formation hippocampique et se répandent par conduction volumique dans une grande partie du cerveau (Sirota et al., 2008). Il a été montré que la puissance du rythme thêta augmente quand le rat court sur une piste (Hinman et al., 2011) ou un tapis roulant (Brankack et al., 1993), et la fréquence et l'amplitude du thêta augmentent avec la vitesse de la course (Hinman et al., 2011). Ces travaux suggèrent donc un rôle du thêta dans le traitement des informations reliées à la vitesse et au déplacement de l'animal dans l'espace (Hasselmo, 2014). Par ailleurs, le rythme thêta dans l'hippocampe est corrélé positivement avec les fonctions d'apprentissage et de mémoire: en effet, une augmentation du rythme thêta est présente pendant une tâche de conditionnement à la peur (Seidenbecher et al., 2003). Cependant, le mécanisme par lequel le

rythme thêta est impliqué dans les processus d'apprentissage reste encore inconnu (Hasselmo, 2014).

Récemment, le concept d'une communication strictement unidirectionnelle entre les régions hippocampiques a été remis en cause par la découverte d'un rythme thêta «inversé», qui commence dans le subiculum et se propage rétrogradement vers CA3. Ainsi l'inactivation du subiculum par injection de procaine en vitro induit des changements dans la décharge des neurones et dans la puissance des potentiels de champ dans CA3. In vivo, ce rythme thêta «inversé» a été observé majoritairement pendant le SP. Il a été suggéré que le rythme thêta «classique» généré de CA3 vers le subiculum serait essentiellement de nature excitatrice, alors que le rythme thêta «inversé» du subiculum vers CA3 serait de nature GABAergique (Jackson et al., 2014).

Les différentes régions hippocampiques peuvent elles-mêmes générer des oscillations thêta indépendantes. Par exemple, l'enregistrement de l'hippocampe isolé en vitro indique que la région CA1 peut générer une activité thêta spontanée (Goutagny et al., 2009).

De plus, des oscillations gamma sont le plus souvent superposées aux oscillations thêta pendant les périodes d'exploration et le SP. Il y aurait deux générateurs indépendants des oscillations gamma dans l'hippocampe: le GD et la région CA3 (Colgin et Moser, 2010).

Les oscillations thêta et gamma étant couplé dans l'hippocampe, il a été proposé que ce couplage jouerait un rôle dans la mémoire (Bott et al., 2015). Ainsi, il a été montré que la puissance du couplage thêta-gamma dans l'aire CA3 augmente au fur et à mesure que les animaux apprennent et qu'elle est corrélée fortement avec la performance des animaux (Tort et al., 2009). De plus, une augmentation temporaire du couplage thêta-gamma a été observée dans le GD au cours d'une tâche d'apprentissage spatial. La puissance des ondes thêta et gamma est très augmentée dans le GD le premier jour d'apprentissage et diminue les jours suivants. Ces résultats indiquent que dans le GD les oscillations thêta et gamma ne sont pas modifiées de façon linéaire pendant une tâche, et qu'il existe un désengagement progressif du GD au cours de l'apprentissage (Bott et al., 2015).

Coordination des réseaux hippocampiques pendant l'EV et le SP

Les régions hippocampiques enregistrées individuellement présentent des potentiels de champ et des activités neuronales unitaires différentes au cours du SP par rapport à l'EV (**Figure 4**, Montgomery et al., 2008). En particulier, l'amplitude des ondes thêta et gamma est plus élevée dans le GD pendant le SP que pendant l'EV actif. Pendant le SP, le GD et la zone CA3 ont également une synchronie plus élevée qu'en EV dans les fréquences thêta et gamma. De

plus, la puissance du gamma diminue dans les régions CA1 et CA3 alors que la puissance du thêta est augmentée dans la zone CA3 mais diminuée dans la région CA1 pendant le SP par rapport à l'EV. La cohérence du gamma entre les régions CA3 et CA1 est également diminuée en SP alors que la cohérence thêta est augmentée entre le GD et l'aire CA1 par rapport à l'EV. Ainsi la région CA3 ne transmettrait pas les ondes thêta et gamma entre les différentes régions hippocampiques pendant le SP à activité tonique (Bragin et al., 1995; Fisahn et al., 1998; Csicsvari et al., 2003; Mann et Paulsen, 2005). Pendant le SP phasique, la coordination entre les réseaux du GD, CA1 et CA3 serait transitoirement augmentée. La communication entre les régions hippocampiques pendant les événements phasiques du SP permettrait que l'information encodée dans le GD pendant le SP soit transmise au néocortex (Louie et Wilson, 2001).

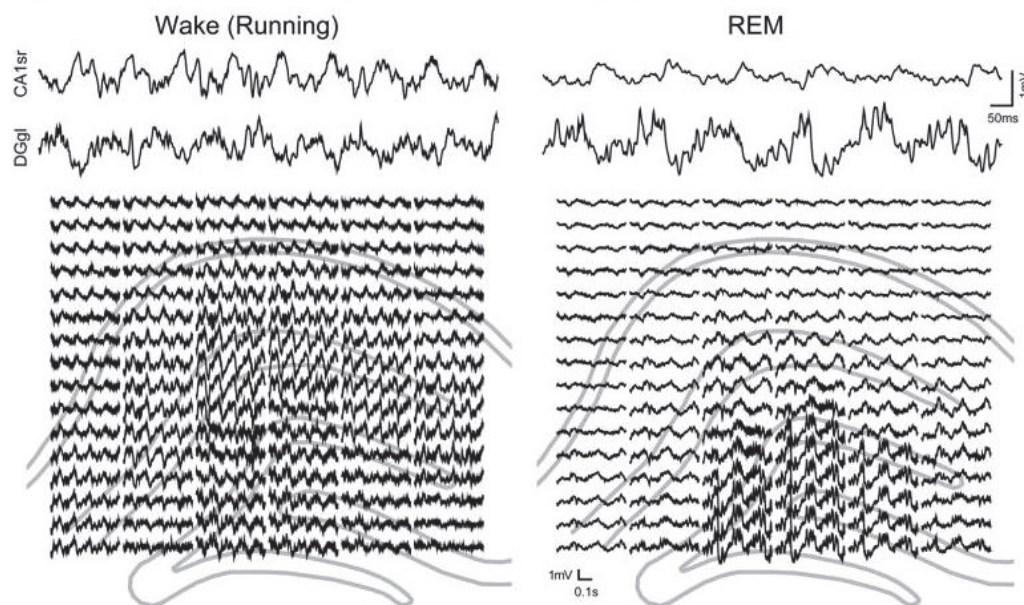


Figure 4. Activité de l'hippocampe pendant l'EV (Wake) et le SP (REM).

Potentiels de champs locaux enregistrés pendant l'EV lorsque le rat cours dans un labyrinthe (tracé gauche) et le SP (tracé droit). Les tracés en haut montrent les enregistrements dans le stratum radiatum de CA1 (CA1sr) et dans la couche granulaire du GD (DGgl, Montgomery et al., 2008).

Il est aujourd'hui établi que la genèse et la modulation du rythme thêta de l'hippocampe ont lieu grâce à trois structures principales: le septum médian, le cortex entorhinal (voir paragraphe 3.4) et le noyau supramammillaire (Kirk et McNaughton, 1991; voir chapitre 5).

3.3 Le septum

Le complexe du septum médian (MS) et de la bande diagonale de Broca (DBB) est le plus connu et le plus étudié des générateurs du rythme thêta.

Ce complexe projette au GD, aux régions CA1 et CA3, au subiculum et au cortex entorhinal (Swanson, 1977). Ses neurones cholinergiques innervent les cellules principales et les interneurons hippocampiques; ses neurones GABAergiques projettent exclusivement aux interneurons hippocampiques inhibiteurs; ses neurones glutamatergiques innervent les régions CA1, CA3 et GD mais les types neuronaux qu'ils ciblent au sein de ces régions sont inconnus. Le MS reçoit des afférences importantes des aires limbiques et néocorticales et plus particulièrement du cortex frontal (Yoshihara et De France, 1976).

Il a été montré que la stimulation à haute fréquence (70 Hz) ou la lésion du MS induit une réduction de l'activité thêta enregistrée dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (Ball et Gray, 1971; Sainsbury et Bland, 1981). De plus, l'injection de procaine (un bloqueur des canaux sodiques) dans le MS réduit très fortement l'amplitude du thêta sans en affecter la fréquence (Kirk et McNaughton, 1993). Enfin, 70% des cellules du MS/DBB déchargent en bouffées rythmiques en phase avec l'activité thêta. Les neurones cholinergiques ont un faible taux de décharge pendant l'activité thêta (Simon et al., 2006). Ils pourraient cependant être responsables de l'intensité du thêta car leur lésion induit l'amplitude de ce rythme sans en modifier la fréquence (Lee et al., 1994).

Les neurones GABAergiques du MS déchargent en bouffées rythmiques en phase avec l'activité thêta. Ils reçoivent des afférences inhibitrices provenant de l'hippocampe et projettent exclusivement sur les interneurons hippocampiques inhibiteurs GABAergiques (Freund et Antal, 1988; Acsády et al., 2000). Ce circuit GABAergique pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité thêta hippocampique en réduisant le niveau global d'inhibition de l'hippocampe (Smythe et al., 1992), mais le mécanisme précis n'a pas encore été déterminé (Houser, 2007).

Récemment il a été montré que les neurones glutamatergiques du MS sont impliqués dans le contrôle du rythme thêta hippocampique pendant la locomotion (Fuhrmann et al., 2015). En effet, quand l'animal se déplace dans l'espace, la décharge des cellules pyramidales de la région CA1 augmente et des oscillations thêta apparaissent, et ces deux phénomènes sont corrélés positivement avec la vitesse de locomotion. Ce processus semble être modulé par les neurones vGLUT2 du MS (Fuhrmann et al., 2015).

Plusieurs études suggèrent l'existence d'un lien important entre le rythme thêta déclenché par le MS et l'apprentissage: en effet, la lésion du MS induit des déficits d'apprentissage spatiale (Martin et al., 2007, Mitchell et al., 1982), qui peuvent être abolis grâce à la stimulation du fornix à un rythme thêta (McNaughton et al., 2006). Peu d'études sont consacré à l'activité thêta générée par le MS au cours du SP, excepté une étude très récente montrant que l'inactivation par optogénétique des neurones GABAergiques du MS pendant le SP après un apprentissage (spatial ou émotionnel) induit une réduction de la puissance du thêta hippocampique au cours du SP et des performances des animaux (Boyce et al., 2016).

3.4 Le cortex entorhinal médian

Le cortex entorhinal fait partie du cortex cérébral et constitue la principale afférence à la formation hippocampique (voie perforante). La partie dorsolatérale de cette région projette sur l'hippocampe dorsal, alors que la partie ventromédiane projette sur l'hippocampe ventral (Dolorfo et Amaral, 1998). La couche II du cortex entorhinal innerve le GD et la région CA3 (Witter, 2007) alors que la couche III innerve la région CA1 et le subiculum (Witter et al., 2000). Les cellules de la couche II se projetant à l'hippocampe sont positives à la reeline, alors que les neurones se projetant sur les régions parahippocampiques expriment la calbindine (Ray et al., 2014; Kitamura et al., 2014; Buralossi et Brecht, 2013). Par ailleurs, les neurones à calbindine sont innervés par des interneurones exprimant la cholécystokinine (CCK, **Figure 5**, Buralossi et Brecht, 2013).

Le rythme thêta enregistré dans le cortex entorhinal est plus ample pendant le SP que pendant l'EV actif (Mitchell et Ranck, 1980). L'activité thêta dans les couches II et IV du cortex entorhinal est en phase avec le rythme thêta de l'aire CA1. L'activité thêta de la couche III est plutôt cohérente avec le rythme thêta du GD (Mitchell et Ranck, 1980). Des enregistrements locaux indiquent que la lésion du cortex entorhinal supprime le thêta du SP dans l'aire CA1 et le réduit dans le GD (Buszaki et al., 1983; Montoya et Sainsbury, 1985).

Le cortex entorhinal peut être divisé en une partie médiane (MEC) et une latérale (LEC) qui ont des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles différentes. Le MEC reçoit des afférences du cortex postrhinal qui en retour reçoit des projections du cortex pariétal,

rétrospécial et visuel. Le LEC reçoit des afférences du cortex perirhinal qui est innervé par les cortex associatifs et sensoriels (Morrissey, 2014).

Le MEC contient plusieurs populations de cellules qui présentent une modalité précise de décharge en fonction de la position dans l'espace et de la direction prise par l'animal. Ces populations de cellules sont indispensables à la représentation dynamique de la localisation de l'animal. Ces cellules particulières sont les cellules de direction de la tête («head-direction cells»), les cellules de bord («boundary cells») et les cellules de grille («grid cells»). Les cellules de direction de la tête déchargent seulement quand la tête de l'animal présente un angle particulier dans le plan horizontal (Taube, 2007); les cellules de bord déchargent seulement quand l'animal est proche d'un bord de l'environnement ou si il est à une distance précise d'un bord; les cellules de grille ont de champs multiples de décharge qui sont organisés en une maille hexagonale sur la surface d'un environnement (Hafting et al., 2005). Les cellules de grille sont majoritairement présentes dans les couches II et III du MEC et présentent une organisation topographique: celles avec de petits champs sont présentes dans la partie dorsale, alors que celles avec les plus grands champs sont présentes dans la partie ventrale du MEC (Brun et al., 2008). Ces cellules montrent un rythme thêta, et l'inactivation du septum altère leur décharge (Koenig et al., 2011). De plus, l'inactivation pharmacologique de l'hippocampe induit la disparition de leur décharge dans le MEC, alors que les autres types cellulaires ne sont pas affectés (Bonnevie et al., 2013).

Récemment, il a été aussi démontré l'existence dans le MEC de cellules de vitesse («speed cells»), qui déchargent en fonction de la vitesse à laquelle l'animal se déplace (Kropff et al., 2015).

Une autre population cellulaire du cortex entorhinal est celle des cellules des îles («island cells») qui font partie de la couche II du MEC et du LEC et projettent à la région CA1. Une étude récente d'optogénétique a induit l'expression d'opsines spécifiquement dans la bande latérale du MEC au niveau de ces cellules. L'activation des axones de ces neurones dans la région CA1 induit une réduction de l'acquisition d'une tâche de conditionnement à la peur (Kitamura et al., 2014). Par ailleurs, l'inhibition des neurones de la couche II du MEC provoque une réduction de l'apprentissage d'une tâche de conditionnement à la peur indicé (Suh et al., 2011).

Le MEC pourrait donc jouer un rôle dans la mémoire émotionnelle. Cependant, du fait de la présence dans cette région des cellules de direction de la tête, des cellules de bord et de celles de grille, la majorité des études de cette région ont été réalisées sur les tâches d'apprentissage spatial. Beaucoup de travaux ont montré des altérations dans la mémoire spatiale suite à des

lésions ou inactivations du MEC; en particulier, l'animal présente des altérations dans sa performance quand la lésion ou l'inactivation comprend la zone caudo-médiale de la partie latérale du MEC (Morrissey et al., 2014). Ces résultats suggèrent que le MEC caudal est fortement impliqué dans la navigation et la mémoire spatiale.

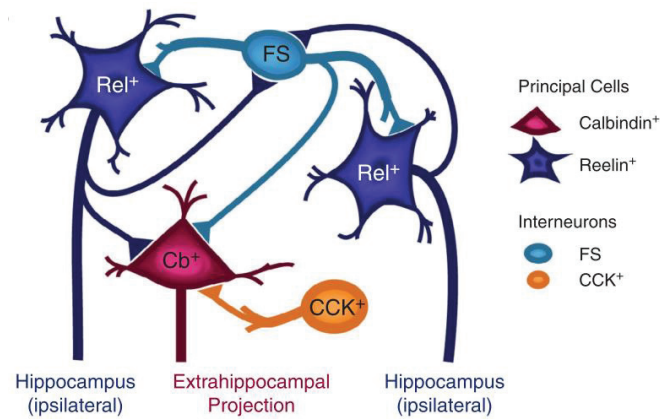


Figure 5. Schéma de l'organisation neuronale de la couche II du MEC.

Les neurones à étoile (putatifs positifs à la reline, Rel+) sont interconnectés par des interneurons à décharge rapide (fast spiking, FS); les cellules pyramidales (putatifs positives à la calbindine, Cb+) sont inhibées par les interneurons positifs à la cholécystokinine (CCK+, Buralossi et Brecht, 2013).

4. Le gyrus dentelé (GD)

4.1 Anatomie du GD

Le GD est composé de trois couches: la couche moléculaire, la couche des cellules granulaires qui contient les corps cellulaires des cellules principales, et le hile (**Figure 6**).

La couche de cellules granulaires est divisée en deux parties, suprapyramidale et infrapyramidale qui ont des caractéristiques différentes. Les cellules granulaires dans la lame suprapyramidale ont des dendrites plus longs (3500 vs 2800 pm) et des épines plus denses (1,6 épines/um contre 1,3 épines/um; Claiborne et al., 1990). Par ailleurs, la couche infrapyramidale reçoit la majorité des afférences du MEC, alors que la couche suprapyramidale reçoit des afférences du LEC (Tamamaki, 1997). De plus, la lame suprapyramidale reçoit deux fois plus de projections du noyau supramammillaire que la couche infrapyramidale (Wyss et al., 1979). Le niveau de prolifération et de survie des nouvelles cellules sont supérieurs dans la couche infrapyramidale par rapport à la couche suprapyramidale (Snyder et al., 2009).

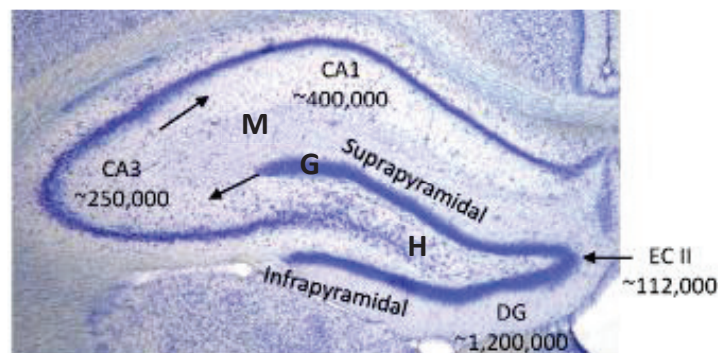


Figure 6. Coupe coronale d'hippocampe dorsal marquée avec une coloration au crésyl violet.

Les 112000 cellules pyramidales du cortex entorhinal (EC) envoient des projections à travers la voie perforante aux 1200000 cellules du gyrus dentelé (GD). Le GD présente une couche moléculaire (M), une couche de cellules granulaires (G) divisée en deux parties suprapyramidale et une infrapyramidale, et le hile (H). Les fibres mossues du GD innervent les 250000 cellules de la région CA3, qui ensuite projettent sur les 400000 cellules de la région CA1 via les collatérales de Shaffer (Schmidt et al., 2012, modifié).

4.2 Le GD sur son axe dorso-ventral

Moser et Moser (Moser and Moser, 1998) ont mis en évidence que l'hippocampe ne serait pas une structure uniforme mais posséderait des fonctions distinctes le long de son axe longitudinal (dorso-ventral chez le rongeur et postéro-antérieur chez l'homme). Sur la base de différenciations anatomiques, génétiques et physiologiques, le GD est généralement divisé en deux régions: le GD dorsal (dGD) et le GD ventral (vGD).

Une étude récente a analysé à l'aide de traceurs rétrogrades les afférences multisynaptiques du dGD et du vDG et a montré une organisation topographique précise des projections directes et indirectes: le dGD reçoit des projections du Sum latéral, du MS médian et du LEC, qui reçoivent des afférences du claustrum dorsal, du noyau endopiriforme rostral, du cortex piriforme rostro-latéral, du raphé médiolatéral, de l'habénula médiale, du septum latéral dorsal et du noyau intrapédunculaire ventral. Le vGD reçoit des afférences du Sum médian, du MEC, du MS latéral, qui reçoivent eux-mêmes des projections du claustrum ventral, du noyau endopiriforme caudal, du cortex piriforme caudo-médial, du raphé médial, de l'habénula médiolatéral, du septum latéral ventral et du noyau intrapédunculaire dorsal (**Figure 7**, Ohara et al., 2013).

Par ailleurs, l'information spatiale des cellules de lieu diminue le long de l'axe dorso-ventral (Jung et al., 1994), et le taux de neurogenèse dans le pôle dorsal est presque le double que dans le pôle ventral (Snyder et al., 2009). De plus, la densité des cellules granulaires diminue le long de l'axe dorso-ventral alors que celle des cellules pyramidales de la région CA3 augmente. Par conséquent, le rapport des cellules granulaires/cellules pyramidales est de 12:1 dans l'hippocampe dorsal et de 2:3 dans l'hippocampe ventral (Amaral et al., 2007).

Par ailleurs, les GD dorsaux et ventraux ne se comportent pas d'une manière similaire pendant les processus neurodégénératifs: chez des souris transgéniques GSK3 β , qui constituent un modèle génétique classique de neurodégénération, une réduction du nombre de neurones granulaires et une astrocytose plus marquée ont été observées dans le dGD par rapport au vGD. Chez ces souris, les comportements d'anxiété ne sont pas modifiés, indiquant que le vGD est moins sensible que le dGD à la dégénérescence (Fuster-Matanzo et al., 2011).

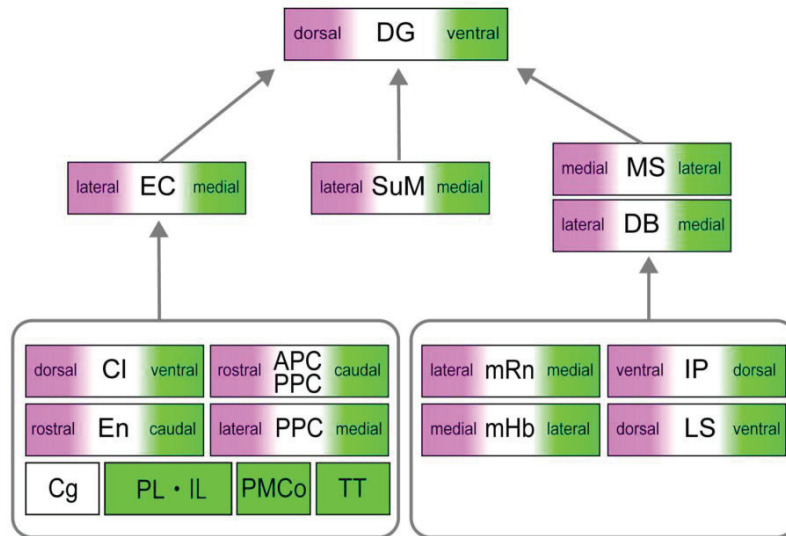


Figure 7. Schéma des afférences mono- et disynaptiques au GD dorsal (dGD) et ventral (vGD).

Les afférences au dGD sont montrées en violet, celles au vGD sont représentées en vert. CI : claustrum ; APC : anterior piriform cortex ; PPC : posterior piriform cortex ; mRn : median raphe nucleus ; mHb : median habenular nuclues ; IP : interpeduncular nucleus ; LS : lateral septum ; Cg : cingulate cortex ; PL : prelimbic cortex ; IL : infralimbic cortex ; PMCo : posteromedial cortical area ; TT : tenia tecta (Ohara et al., 2013).

4.3 Le GD et la séparation des patrons d'information («pattern separation »)

Le GD est la région de l'hippocampe responsable de la séparation des patrons d'information, un processus qui consiste à former des mémoires spécifiques pour des événements qui partagent des composants communs et à les convertir en représentations qui sont moins facilement confondues (Lee et Solivan, 2010). Grâce à ce processus, il est possible de se rappeler et de distinguer deux expériences différentes qui ont eu lieu dans le même endroit à des moments différents.

Un grand nombre d'études chez le rongeur a démontré le rôle clef du GD dans la fonction de séparation des patrons d'information. Par exemple, des rats ayant une lésion au niveau du dGD présentent un déficit dans la discrimination spatiale de deux objets, et cette discrimination dépend de la distance relative des objets: les rats lésés n'arrivent pas à discriminer des objets proches; cependant, leur performance augmente lorsque la distance entre les deux objets augmente (Gilbert et al., 2001). Les rats avec une lésion du dGD sont aussi incapables de détecter un changement de distance métrique entre deux objets dans un labyrinthe (Goodrich-Hunsaker et al., 2008). Les résultats de ces études suggèrent que le

dGD est important pour réduire les interférences entre les représentations spatiales similaires et qu'il est particulièrement impliqué dans la détection des distances métriques (Kesner, 2013). Par ailleurs, une augmentation du flux sanguin dans le GD et la région CA3 a été montrée chez l'homme après présentation d'objets très similaires mais pas identiques (Bakker et al., 2008).

La séparation des patrons d'information serait due à l'activation de groupes distincts de cellules du GD dans des contextes distincts. En effet, l'exposition de l'animal à deux contextes similaires mais pas identiques active deux groupes distincts de cellules dans le GD (Deng et al., 2013). Soutenant ces résultats, des travaux de neuroanatomie ont montré que des ensembles distincts de cellules granulaires expriment l'ARNm de ARC quand un rat visite des contextes distincts. En revanche, lorsque le rat a traversé deux fois le même contexte, les mêmes ensembles de cellules granulaires expriment ARC (Chawla et al., 2005). De plus, quand les rats ont exploré le même environnement deux fois environ 70% des cellules exprimant *zif268* la première fois l'expriment aussi la deuxième. Inversement, lorsque les deux contextes sont différents il y a un chevauchement de seulement 35% (Marrone et al., 2011). Ces résultats indiquent que l'activation de sous-populations de cellules granulaires dépend du contexte auquel l'animal est exposé (**Figure 8A**).

Ces résultats semblent être en désaccord avec d'autres études montrant que les mêmes populations cellulaires (correspondantes au 2-4% des cellules granulaires) sont actives dans plusieurs environnements différents. Ces populations changeraient leur modalité de décharge au fer et au mesure des changement du contexte (Leutgeb et al., 2007).

Il a été proposé que la neurogenèse dans le dGD puisse contribuer à la séparation des patrons d'information. Les cellules granulaires (GC) immatures pourraient être à l'origine d'un processus d'intégration temporelle pour former des associations entre des événements temporellement contigus. Les événements proches dans le temps pourraient être codée par des GC immatures, tandis que les événements plus espacés dans le temps pourraient être codés par différentes populations de GC matures (Aimone et al., 2010, voire paragraphe 4.5).

Par ailleurs, l'étude de l'expression des IEG suggère que les cellules granulaires dans la lame suprapyramidale et infrapyramidale du GD présentent un niveau d'activité différent. En particulier, suite à une tâche de reconnaissance d'objet les expressions d'ARC et de *zif268* sont augmentés dans la couche suprapyramidale par rapport à la couche infrapyramidale du dGD (**Figure 8B**, Schmidt et al., 2012). Enfin, quand l'animal est placé dans deux contextes très similaires (A/A') ou différents (A/B) le niveau d'activation de la couche infrapyramidale

reste le même, alors que celui de la couche suprapyramidale augmente (**Figure 8C**, Schmidt et al., 2012).

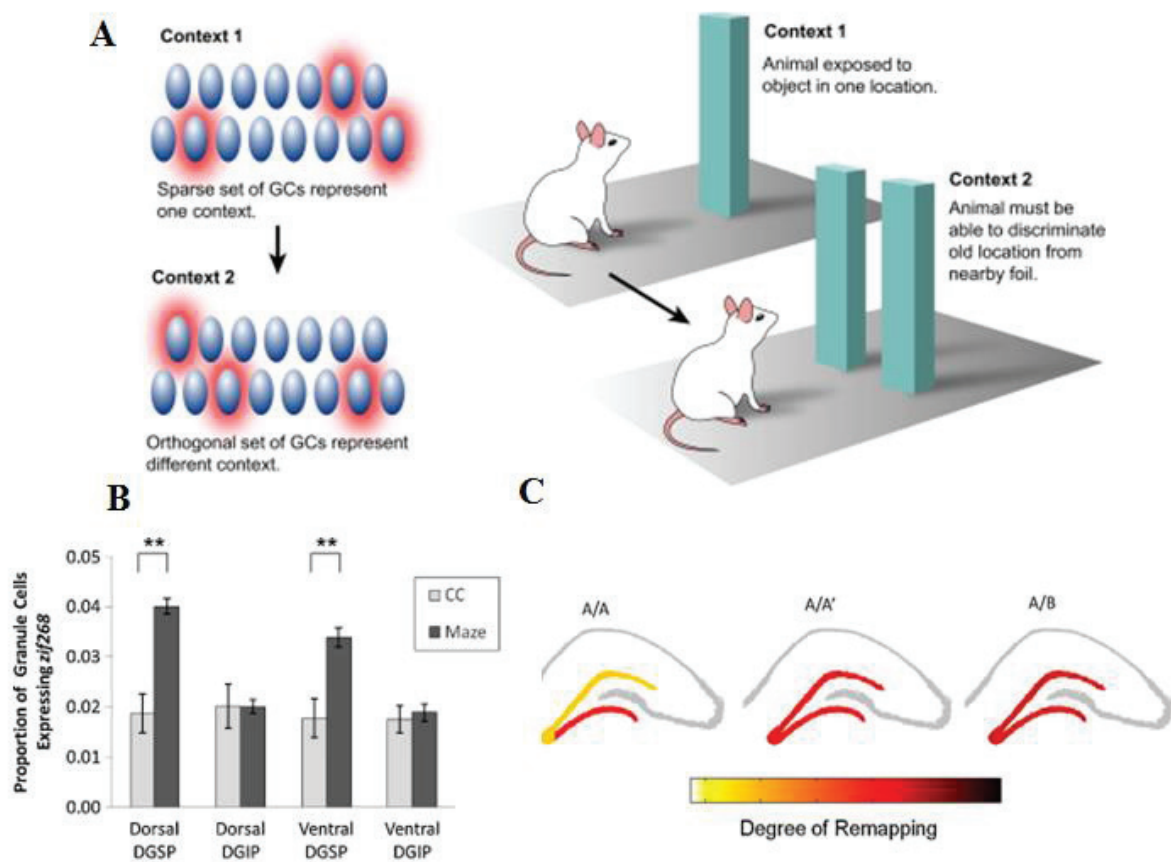


Figure 8. La séparation des patrons d'information dans le GD.

- (A) Mécanisme de pattern séparation dans le GD: deux contextes différents activent deux populations différentes de cellules granulaires (Aimone et al., 2011, modifié).
- (B) Les couches infrapyramidale et suprapyramidale du DG ne se comportent pas de même façon pendant une tâche de mémoire spatiale chez le rat. Une grande quantité de cellules granulaires exprime *zif268* dans la couche suprapyramidale (DGSP) par rapport à l'infrapyramidale (DGIP) du dDG et vDG pendant l'exploration spatiale (Schmidt et al., 2012).
- (C) La mesure de l'expression des IEG suggère que quand l'animal est placé dans deux contextes similaires (A/A') ou distincts (A/B), la couche suprapyramidale est très active, alors que l'activité de la couche infrapyramidale reste constante pendant toute l'expérience (Schmidt et al., 2012).

4.4 Le GD et la mémoire émotionnelle

Chez l'homme comme chez l'animal, la mémoire déclarative est modulée par les émotions. En effet, on se souviendra mieux d'un événement qui nous affecte émotionnellement par

rapport à un événement quotidien considéré comme neutre (Buchanan, 2007; Conway et al., 1994). L'amygdale régulerait l'encodage et la consolidation des traces mnésiques dans l'hippocampe en y attribuant une tonalité émotionnelle (Roosendaal et al., 2009). L'identification de ce circuit hippocampo-amygdalien comme support neuronal de la mémoire émotionnelle a été en grande partie assurée par l'utilisation du modèle de conditionnement à la peur chez le rongeur (Johansen et al., 2011). Lors de ce conditionnement, on présente aux animaux un stimulus neutre ou conditionnel (SC, un contexte, un son, ...) puis on applique un stimulus aversif ou inconditionnel (SI, un choc électrique par exemple) qui induira une réaction de peur. La présentation ultérieure du SC seul provoquera alors une réaction de peur dite conditionnée puisque l'animal aura associé à ce stimulus initialement neutre une charge émotionnelle due à la présentation conjointe du SI (**Figure 9**).

Pour évaluer les performances du rongeur dans une tâche de conditionnement à la peur, on étudie et quantifie son comportement d'immobilisation (freezing), caractérisé par une absence totale de mouvements, à l'exception des mouvements respiratoires (Fanselow, 1980). La forme contextuelle du conditionnement à la peur est à la fois un apprentissage spatial (un contexte consiste ici en une association de différents éléments multisensoriels) hippocampo-dépendant et un apprentissage émotionnel amygdalo-dépendant (application d'un choc électrique). Il existe aussi un autre type de conditionnement à la peur, appelé indicé qui utilise un son isolé comme SC et ne requiert donc pas de mémoriser une association de stimuli (contexte). L'inactivation pharmacologique de l'amygdale bloque l'acquisition des deux types de conditionnements ce qui est cohérent avec un rôle de l'amygdale dans l'attribution de la tonalité émotionnelle (Maren et al., 1996) nécessaire aux deux types de conditionnement. En revanche, l'inactivation pharmacologique de l'hippocampe dorsal diminue les performances lors d'un conditionnement contextuel à la peur, mais n'affecte pas les performances lors d'un conditionnement à la peur indicé (Stiedl et al., 2000). Donc le dGD n'est pas impliqué dans le conditionnement à la peur indicé (Phillips et LeDoux, 1992; Kheirbek et al., 2013) mais il est crucial pour l'encodage d'informations spatiales et contextuelles (Kheirbek et al., 2013; Hernández-Rabaza, 2008; Agnostonaras et al., 2001). Ainsi, la stimulation par optogénétique du dGD induit une augmentation des comportements exploratoires (Kheirbek et al., 2013). Le vGD n'est pas nécessaire pour l'apprentissage spatial, mais il est essentiel pour les comportements d'anxiété (Kheirbek et al., 2013) et pour la séparation des patrons d'information liée à l'information olfactive (Kesner, 2013).

Conditionnement contextuel à la peur

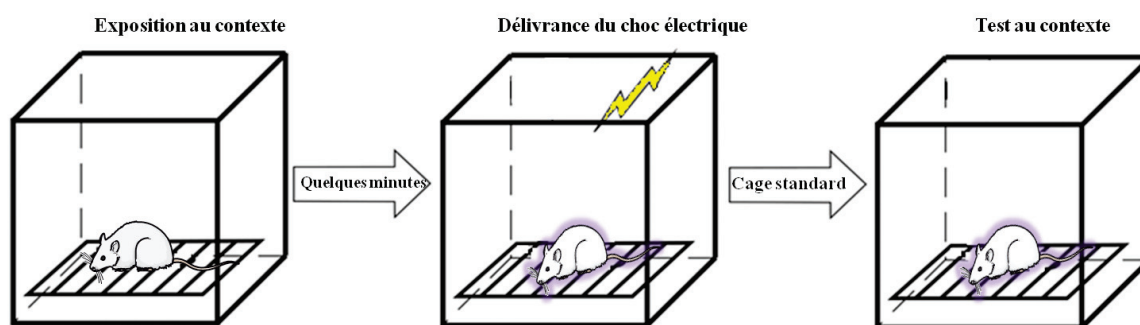


Figure 9. Dispositif expérimental de peur conditionnée au contexte.

Ce paradigme expérimental utilise la capacité des animaux qui, dans la nature, apprennent à anticiper le danger en associant les stimuli environnementaux aux événements aversifs qui se produisent conjointement. Dans le conditionnement contextuel à la peur, un stimulus neutre ou conditionnel (SC), ici le contexte (la cage expérimentale, l'environnement de la pièce...), entraîne une réponse comportementale conditionnée après avoir été associée à un stimulus inconditionnel tel qu'un choc électrique (SI).

4.5 Le GD et la neurogenèse

Avec la zone sous-ventriculaire, le GD est la seule région du cerveau qui génère en permanence des nouveaux neurones. Les cellules en prolifération sont localisées dans la zone sous granulaire, entre la couche granulaire et le hile (Gross, 2000). Devenues matures, la majorité de ces cellules libère du glutamate, alors qu'une petite population libère du GABA (Wang et al., 2000). Chez le rat, approximativement 9000 nouvelles cellules sont générées chaque jour, 1400 chez l'homme. Pendant leur première semaine de vie, les neurones nouveau-nés ne présentent pas d'activité synaptique; la deuxième semaine, ils commencent à exhiber des petits potentiels d'action et des dendrites; à partir de la troisième semaine, les épines dendritiques apparaissent (Yau et al., 2015). Les neurones nouveau-nés reçoivent des projections excitatrices des cellules granulaires matures, les cellules moussues du hile, les cellules pyramidales de la région CA3 et celles du mENT et du cortex perhinal. Ces neurones établissent de fortes connexions avec la région CA3 et les interneurons hippocampiques, ce qui suggère qu'ils pourraient inhiber des populations spécifiques du GD. Une petite population de neurones nouveau-nés pourrait donc potentiellement moduler l'activité de tout l'hippocampe, et ce mécanisme pourrait être à la base du phénomène de séparation des patrons d'informations (Myers et Scharfman, 2011).

En effet, il existe un lien très fort entre la neurogénèse et les processus de mémoire et apprentissage dans l'hippocampe: les rats (Nilsson et al., 1999) et les souris (Iso et al., 2007) en environnement enrichi pendant 4-8 semaines présentent une augmentation du nombre de neurones en prolifération (immunoréactifs à la bromodésoxyuridine ou BrdU) dans le GD et cet effet est associé à de meilleures performances spatiales. Par ailleurs, l'élimination de la neurogénèse par irradiation réduit les performances des souris dans une tâche spatiale où l'animal doit distinguer deux objets contigus (Clelland et al., 2009). Au contraire, la potentialisation de la neurogénèse augmente la capacité des souris à discriminer entre deux représentations similaires (Sahay et al., 2011).

La neurogénèse est donc fortement impliquée dans les phénomènes d'apprentissage, mais elle est aussi en relation avec le sommeil: de nombreuses études ont montré qu'une privation prolongée de sommeil (à partir de 72h) chez le rat perturbe fortement la prolifération cellulaire dans le GD (Mirescu et al., 2006). La même réduction de prolifération a été observée après privation totale de sommeil et privation sélective de SP, ce qui suggère une influence du SP plutôt que du SL sur la neurogénèse chez l'animal adulte (Guzman-Marín et al., 2005, 2008). Par ailleurs, le niveau de prolifération cellulaire dans le GD suite à privation de SP ou à stimulation lumineuse (qui affecte les rythmes circadiens mais pas les quantités de SP) a été comparé. Les résultats montrent une réduction de 50% des cellules marquées au BrdU dans le GD dans le groupe d'animaux privés en SP et pas dans celui soumis à une illumination constante. La neurogénèse semble donc être indépendante des rythmes circadiens et fortement dépendante du SP (Mueller et al., 2011). Cependant, les mécanismes de modulation de la neurogénèse par le sommeil et en particulier le SP restent encore inconnus.

5. Le noyau supramammillaire (Sum)

Le noyau supramammillaire (Sum) est une structure caudale de l'hypothalamus située dorsalement aux corps mammillaires. Le Sum contient des types cellulaires variés incluant des neurones à acétylcholine (Ach), sérotonine, cholecystokinine (CCK), à calrétinine, dopaminergiques, aspartatergiques, glutamatergiques, GABAergiques, à substance P et au vasoactive intestinal peptide (VIP) (Swanson, 1982; Gall et Selawski, 1984; Haglund et al., 1984; Kiyama et al., 1984; Ino et al., 1988; Carnes et al., 1990; Gonzalo-Ruiz et al., 1992; Lantos et al., 1995; Leranth et Kiss, 1996; Borhegyi et Leranth, 1997; Kocsis et al., 2003).

Le Sum est divisé en deux parties: le Sum médian (SumM), qui contient des petites cellules en forte densité, et le Sum latéral (SumL), qui est composé de plus grosses cellules dispersées parmi des petites cellules peu regroupées (Borhegyi et Leranth, 1997).

5.1 Afférences du Sum

Les afférences principales au Sum en provenance de régions caudales proviennent du noyau tegmental latérodorsal, du raphé et de la substance grise périaqueducule. Il n'y a pas d'évidence d'une connexion directe monosynaptique de la formation réticulée pontique au Sum, cependant il a été montré chez le rat anesthésié que la stimulation de cette région module le thêta hippocampique induit par le Sum (Kirk et McNaughton, 1993).

Les afférences principales des régions rostrales au Sum proviennent du cortex infralimbique, du cortex pédunculaire, de la bande diagonale de Broca, du septum, de l'habenula latérale et de l'aire préoptique (Vertes et Martin, 1988; Kiss et al., 2002; Pan et McNaughton, 2004).

5.2 Efferences du Sum

Le Sum projette au septum, à l'aire préoptique, à de nombreux noyaux thalamiques médians, sous-thalamiques et à plusieurs parties de l'hypothalamus, à l'amygdale, au cortex frontal, à la

bande diagonale de Broca, à l'hippocampe, à la zona incerta, à la substance grise périaqueducule et au raphé dorsal.

Le SumL projette au claustrum, aux cortex cingulaire, entorhinal et infralimbique. le SumM projette aux corps mammillaires (**Figure 10**; Vertes, 1988; Kiss et al., 2000; Pan et McNaughton, 2004).

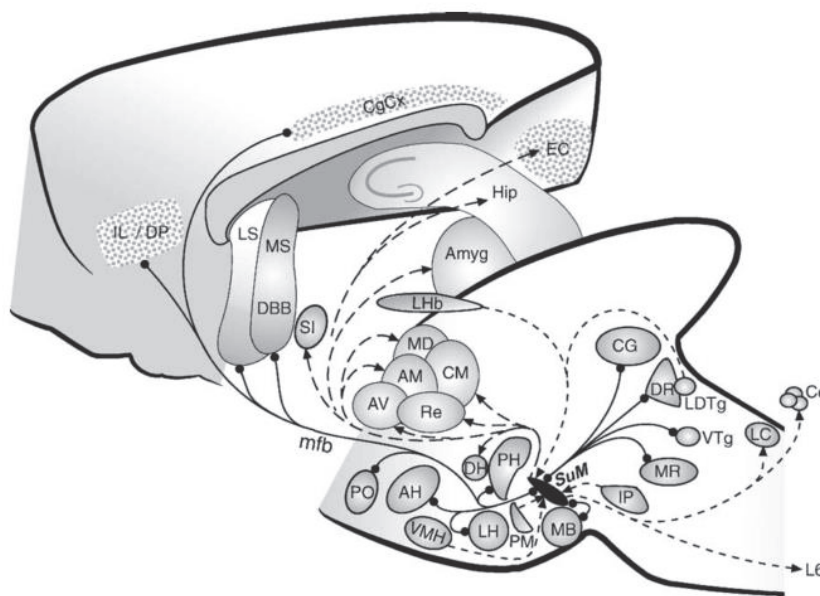


Figure 10. Connexions générales du Sum sans ses divisions internes.

Les lignes en pointillés avec des flèches indiquent les connexions unidirectionnelles, les lignes solides avec des ronds indiquent les connexions bidirectionnelles. Abréviations: AH, aire hypothalamique antérieure; AM, aire hypothalamique médiane ; Amyg, amygdale; AV, noyau thalamique ventral ; Ce, cervelet ; CG, substance grise périaqueducule; CgCx cortex cingulaire; CM, noyau thalamique médian; DBB, bande diagonale de Broca; DH, aire hypothalamique dorsale; DP, cortex pédonculaire dorsal; DR, noyau raphé dorsal; EC, cortex entorhinal; Hip, hippocampe; IL, cortex infralimbique; IP, noyau interpedonculaire; L6, corne spinale, lamina 6; LC, locus coeruleus; LDTg, noyau tegmental latéro-dorsal; LH, hypothalamus latéral; LHb, habénula latérale; LS, noyau septal latéral; MB, corps mammillaire; MD, noyau thalamique médio-dorsal; MR, noyau du raphé médian; MS, septum médian; PH, hypothalamus postérieur; PM, noyau prémammillaire; PO, noyau préoptique; Re, noyau reuniens; SI, substance inominée; SuM, noyau supramammillaire; VMH, hypothalamus ventromédian; VTg, noyau tegmental ventral (Pan et McNaughton, 2002).

5.3 La voie de projection Sum-hippocampe

La projection du Sum sur l'hippocampe est unidirectionnelle et monosynaptique (Magloczky et al., 1994; Vertes, 1992).

Le SumL projette préférentiellement aux couches supragranulaire et moléculaire du dGD. Il projette moins densément aux régions dorsales de CA2 et CA3 et au vGD (Vertes, 1992). Les

terminaisons axonales des neurones du SumL dans le GD contiennent une des enzymes de synthèse du GABA (la glutamate décarboxylase 65 ou GAD65), le transporteur vésiculaire au GABA (vGAT), ainsi que le transporteur vésiculaire 2 du glutamate (vGLUT2). Les terminaisons axonales du SumL dans le dGD sont donc potentiellement excitatrices et inhibitrices (Soussi et al., 2010).

Le SumM innervé le vGD et les cellules pyramidales des régions CA2 et CA3. Les terminaisons axonales de cette voie contiennent uniquement le vGLUT2, les neurones du SumM seraient donc excitateurs (Boulland et al., 2009; Soussi et al., 2010).

5.4 Rôle du Sum dans l'apprentissage

Du fait de ses projections directes à l'hippocampe, les études sur le rôle du Sum se sont principalement focalisées sur des fonctions émotionnelles et mnésiques dépendantes de l'hippocampe.

Lorsque l'animal est placé en situation de stress ou d'anxiété, une forte augmentation de la protéine FOS est observée dans le Sum suggérant un rôle de ce noyau dans le traitement des réponses émotionnelles (Silveira et al., 1993). Le nombre de neurones FOS+ dans le Sum augmente également après stimulation électrique ou pharmacologique de l'hypothalamus médian ou de la substance noire périaqueducale, deux aires impliquées dans le système de défense (Sandner et al., 1992; Silveira et al., 1995).

Par ailleurs, en conditions de stress et après injection d'un traceur rétrograde dans l'hippocampe, il a été montré que le 53% de cellules du Sum rétrogradement marquées expriment la sérotonine, 31% libère l'Ach et 56% expriment le facteur de libération de la corticotropine. Le Sum semble donc contenir plusieurs populations cellulaires qui répondent différemment au stress (Choi et al., 2012).

Le Sum est également associé à d'autres comportements émotionnels comme le comportement d'évitement passif. L'inactivation du Sum induit une altération de la rétention mais pas de l'acquisition immédiate du test d'évitement passif chez le rat (Shahidi et al., 2004a). La lésion du Sum induit aussi une augmentation du niveau d'exploration et une réduction de la réponse d'évitement dans le test de «elevated T-maze» (Aranda et al., 2006).

Les lésions du SumM altèrent le conditionnement contextuelle à la peur sans affecter le conditionnement de peur indicé (Pan et McNaughton, 2002). Par ailleurs, l'injection dans le Sum de drogues anxiolytiques (diazepam) induit une réduction du temps de freezing et de l'expression de la protéine FOS dans le Sum (Beck et Fibiger, 1995).

Ces résultats indiquent que le Sum pourrait jouer un rôle dans le comportement défensif et dans le contrôle des réponses émotionnelles.

De plus, les lésions du Sum altèrent les performances mnésiques des rats lorsqu'ils sont soumis au test de la piscine de Morris, test qui permet d'étudier l'apprentissage et la mémoire spatiale et qui dépend principalement de l'hippocampe (Morris et al., 1982; Pan et McNaughton, 2002; Shahidi et al., 2004b; Aranda et al., 2006, 2008). Le nombre de neurones exprimant la protéine FOS dans le Sum est augmenté lors du test de la piscine de Morris plus fortement lors des tests de mémoire de travail que lors des tests de mémoire de référence (Santin et al., 2003). La lésion ou l'inhibition du SumM pendant cette tâche s'accompagne d'une diminution de la fréquence du thêta d'environ 0,4 Hz (Pan et McNaughton, 2002).

Le Sum semblerait jouer un rôle minimal dans la mémoire spatiale de référence. En effet, la lésion du Sum n'empêche pas l'animal de trouver sa récompense, quand elle se trouve toujours au même endroit. Dans ce type d'apprentissage, le Sum semblerait être impliqué plutôt dans la rétention que dans l'acquisition ou la consolidation de l'information spatiale. En revanche, le Sum semble jouer un rôle important dans la mémoire spatiale de travail. En effet, quand on modifie la position de la récompense pendant la tâche, chez un animal avec une lésion du Sum, il n'est pas capable de mémoriser l'emplacement de la récompense (Aranda et al., 2006, 2008).

Le Sum serait aussi impliqué dans le système de récompense. La stimulation pharmacologique du Sum entraîne une augmentation du nombre de neurones FOS+ dans les régions impliquées dans le système de récompense (Shin et Ikemoto, 2010). De plus, les rats appuient frénétiquement sur un levier qui induit l'infusion de substances excitatrices dans le Sum (Ikemoto et al., 1997, 2004).

Le Sum est donc impliqué dans les émotions et la cognition lors de l'EV. Ces fonctions sont aussi présentes pendant le SP et le Sum pourrait jouer un rôle pendant cet état.

5.5 Rôle du Sum dans les mécanismes de génération du rythme thêta hippocampique

D'après les travaux chez l'animal anesthésié, certaines cellules du Sum déchargent rythmiquement en phase avec l'activité thêta hippocampique (Kocsis et Vertes, 1994). De plus, lorsque le thêta hippocampique est supprimé par des lésions du septum, le rythme thêta enregistré dans les cellules du Sum n'est que très légèrement modifié (Kirk et McNaughton, 1991; Kirk et al., 1996). Ainsi, les cellules du Sum peuvent générer ce rythme indépendamment des cellules du septum.

Par ailleurs, chez le rat anesthésié, l'injection de procaine dans le Sum provoque une réduction de la fréquence et de la puissance de l'oscillation thêta hippocampique induite par la stimulation électrique de la formation réticulée. En revanche, l'injection de procaine dans le septum induit une réduction de la puissance mais pas de la fréquence du thêta. Ces résultats suggèrent que le Sum pourrait jouer un rôle dans la régulation de la fréquence et de la puissance du thêta de l'hippocampe (Kirk et McNaughton, 1993).

D'autres études réalisées chez le rat anesthésié ont porté sur la stimulation électrique du Sum. Deux effets majeurs ont été observés après stimulation de ce noyau. Le premier est un effet potentiellement inhibiteur de courte latence (reflétant une connexion monosynaptique) sur au moins 50% des neurones du GD (Segal, 1979). Le second effet correspond à une facilitation des potentiels d'action des cellules granulaires du GD induits par stimulation de la voie perforante (Mizumori et al., 1989; Kirk et McNaughton, 1991; Nakanishi et al., 2001). Le même effet de facilitation a été aussi observé après injection de glutamate dans le SumL chez le rat anesthésié (Carre et Harley, 1991). Les lésions du septum n'empêchent pas cette stimulation de l'hippocampe par le Sum (Mizumori et al., 1989). Cette potentialisation induite par des stimulations du Sum et de la voie perforante est abolie par les lésions du fornix-fimbria, une voie majeure empruntée par les efférences du Sum ou lorsque la transmission GABAergique est bloquée par de la picrotoxine (Nakanishi et al., 2001). L'activité du Sum serait donc transférée directement à l'hippocampe sans relation avec la voie indirecte qui passe par le septum médian. La stimulation du Sum pourrait agir via une neurotransmission excitatrice glutamatergique directe sur le GD (Magloczky et al., 1994) ou via une inhibition des interneurons inhibiteurs (Mizumori et al., 1989). La coexistence de glutamate et de GABA dans les terminaisons du Sum permettrait simultanément de dépolariser les dendrites et d'hyperpolariser le soma des cellules granulaires du GD. Cette voie permettrait aux cellules

granulaires du GD de décharger avec une haute précision temporelle quand la voie perforante et le Sum déchargent en même temps (Pan et McNaughton, 2002). Grâce à ces mécanismes à la fois activateurs et inhibiteurs, le Sum pourrait moduler l'activité thêta de l'hippocampe.

Cependant toutes ces études ont été réalisées sur le rat anesthésié et se sont intéressées principalement à la voie indirecte Sum-GD, qui passe par la voie perforante ou qui provient de la formation réticulée. Seulement une étude sur la voie directe Sum-GD a été réalisée chez le rat libre de se mouvoir. Les résultats de ce travail indiquent que les lésions du Sum n'affectent pas le rythme thêta accompagnant les mouvements spontanés (Thinschmidt et al., 1995).

Une étude au laboratoire indique que le nombre de neurones FOS+ augmente dans le Sum après une hypersomnie de SP de 3 heures chez le rat (Sapin et al., 2010). Nous avons aussi démontré que l'activation du GD pendant le SP dépend du Sum (Renouard et al., 2015). Par ailleurs, nous avons montré que la lésion du Sum chez le rat induit une réduction de la puissance du thêta, une augmentation de la puissance du sigma dans l'EEG et une forte réduction des neurones FOS+ dans le GD (Renouard et al., 2015). Cependant, le rôle du Sum dans l'activité électrophysiologique du GD pendant le SP n'a jamais été étudié.

OBJECTIFS

ETUDE 1. Déterminer les neurones corticaux qui sont modifiés au cours du SP

Comme déjà évoqué à plusieurs reprises au cours de mon introduction, une étude récente menée au laboratoire nous a permis de déterminer le niveau d'activation corticale au cours du SP (Renouard et al., 2015). Nous avons comparé l'expression des protéines FOS, COX2, ARC, BDNF chez 3 groupes d'animaux: des rats témoins ayant un cycle veille-sommeil basal, des rats privés sélectivement de SP et des rats ayant subi une privation de SP suivie par une phase de récupération, au cours de laquelle s'effectue un remboursement de la dette de SP (rebond de SP). Par cette approche de neuroanatomie fonctionnelle, nous avons ainsi montré que l'activation corticale pendant l'hypersomnie de SP est limitée à quelques structures limbiques déterminantes pour l'apprentissage et la mémoire: le GD de l'hippocampe et les cortex rétrospécial, entorhinal médial, amygdalien et cingulé antérieur (Renouard, et al, 2015). J'ai contribué à cette étude en réalisant l'immunomarquage pour la protéine ARC chez les trois groupes d'animaux en effectuant le comptage des neurones immunopositifs pour cette protéine dans plusieurs régions corticales. De plus, j'ai réalisé l'analyse du marquage pour le facteur BDNF également chez les trois groupes d'animaux.

Ce travail nous a donc permis de finaliser le papier qui a été récemment publié.

ETUDE 2. Déterminer la nature neurochimique des neurones SP-on du Sum

Le Sum est une région fortement activée pendant le SP (Sapin et al., 2010) qui semble être responsable de l'activation du GD au cours du SP (Renouard et al., 2015). Par ailleurs, les terminaisons du Sum dans le GD ont un phénotype unique à la fois glutamatergique et GABAergique (Soussi et al., 2010).

Cependant, la nature neurochimique de la voie Sum-GD active spécifiquement pendant le SP n'a jamais été étudiée.

Le premier objectif de cette étude a donc été de confirmer le double phénotype glutamatergique et GABAergique des neurones SP-on du Sum. Pour cela, nous avons

combiné l'hybridation *in-situ* du transporteur vésiculaire 2 du glutamate (vGLUT2, marqueur spécifique des neurones glutamatergiques) ou du transporteur vésiculaire du GABA (vGAT, marqueur spécifique des neurones GABAergiques) avec l'immunohistochimie de FOS chez trois groupes d'animaux: des rats témoins, des rats privés sélectivement de SP et des rats ayant subi une privation de SP suivie par une phase rebond de SP (RSP).

Le deuxième objectif de cette étude a été de déterminer l'effet de la lésion du Sum sur l'activation du GD pendant le SP, en analysant séparément les parties dorsale et ventrale du GD qui ont des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles très différentes (Ohara et al., 2013; Kheirbek et al., 2013). Après avoir effectué une lésion neurochimique du Sum par injection iontophorétique d'acide iboténique, nous avons donc analysé le nombre de neurones immunoreactifs pour FOS dans le dGD et le vGD des rats RSP lésés par rapport aux RSP sham.

Le troisième objectif de cette étude a été de déterminer la nature neurochimique des terminaisons du Sum dans le GD. Ainsi, nous avons analysé la densité des axones immunoréactifs au vGLUT2 dans le GD de rats RSP lésés par rapport à des rats RSP sham.

Le quatrième objectif de cette étude a été de déterminer la(les) région(s) responsable(s) de l'activation du vGD au cours du SP. Pour cela, le traceur rétrograde Fluorogold (FG) a été éjecté dans le vGD chez des rats soumis ensuite au protocole de privation/rebond de SP. Le double marquage FOS/FG après hypersomnie de SP nous a permis de déterminer quelles régions projettent au vGD et sont actives pendant le SP.

ETUDE 3. Déterminer le rôle pendant le SP de la projection du Sum sur le GD

Le troisième objectif de ma thèse a été de réaliser la caractérisation fonctionnelle de la voie neuronale Sum-GD pendant le SP. Pour répondre à cette question, j'ai mis en place pour la première fois au laboratoire la technique d'optogénétique, qui permet de manipuler les neurones d'intérêt ciblés moléculairement avec une résolution spatiale et temporelle très fine. Nous avons donc induit l'expression d'opsines spécifiques dans les neurones vGLUT2 du Sum par l'injection stéréotaxique d'AAVs cre-dépendants chez des souris transgéniques knock-in Cre-vGLUT2 (Zhang et al., 2010). Les souris ont été implantées avec des électrodes EEG, EMG et une électrode LFP au niveau du dGD. Nous avons ainsi déterminé les effets de

l'activation ou l'inactivation optogénétique des neurones glutamatergiques du Sum pendant le SP sur:

- l'activation neuronale dans le Sum et le GD, évaluée par immunomarquage FOS;
- l'activité électrophysiologique locale (LFP) dans le GD à l'aide d'une l'électrode.

ETUDE 1. Les neurones corticaux qui sont modifiés au cours du SP

1. Contexte

Plusieurs études ont montré que l'activation corticale pendant le SP n'était pas identique à celle de l'EV, cependant les populations de neurones corticaux activées au cours du SP et les mécanismes sous-corticaux responsables de cette activation restent encore largement inconnus.

Pour répondre à cette question, Leslie Renouard, étudiante en thèse au laboratoire a comparé l'expression génique dans le néocortex et l'hippocampe chez trois groupes de rats: rendus hypersomniaques de SP, privés de SP et témoins. Ensuite, elle a analysé chez ces trois groupes d'animaux le niveau d'expression des marqueurs d'activité et de plasticité neuronale FOS et COX2, au niveau hippocampique et néocortical. Ma contribution à cette étude a été d'analyser le nombre de neurones immunopositifs pour ARC et BDNF chez les 3 groupes d'animaux.

Les résultats indiquent que dans l'hippocampe, l'expression de BDNF et ARC augmente spécifiquement au niveau du GD chez le groupe rebond par rapport aux autres conditions expérimentales.

Dans les cortex sensoriels (cortex auditif, moteur, somatosensoriel, visuel et piriforme), l'expression de ARC mais pas celle de BDNF augmente chez le groupe privé par rapport aux autres conditions. Dans plusieurs structures limbiques (le cortex rétrosplénial, amygdalien, entorhinal et le claustrum) l'expression de BDNF et de ARC augmente chez le groupe rebond par rapport au groupe témoin et augmente ou est similaire par rapport au groupe privé. Dans le cortex cingulé antérieur, l'expression de BDNF augmente chez le groupe rebond, alors que celle d'ARC augmente chez le groupe privé par rapport aux autres groupes d'animaux.

Ces résultats montrent pour la première fois que pendant l'hypersomnie de SP l'expression des protéines impliquées dans l'activation et la plasticité neuronale augmente dans des populations de neurones localisés dans certaines structures limbiques, en particulier le GD.

Ce travail a été récemment publié dans le journal «Science Advances».

2. Article 1

The supramammillary nucleus and the claustrum activate the cortex during REM sleep

Leslie Renouard¹, Francesca Billwiller¹, Keiko Ogawa¹, Olivier Clément¹, Nutabi Camargo¹, Mouaadh Abdelkarim¹, Nadine Gay¹, Céline Scoté-Blachon¹, Rouguy Touré¹, Paul-Antoine Libourel¹, Pascal Ravassard¹, Denise Salvert¹, Christelle Peyron¹, Bruno Claustat², Lucienne Léger¹, Paul Salin¹, Gael Malleret¹, Patrice Fort¹ and Pierre-Hervé Luppi^{1*}

¹UMR 5292 CNRS/U1028 INSERM, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL), Team "Physiopathologie des réseaux neuronaux responsables du cycle veille-sommeil", Université Claude Bernard Lyon I, Faculté de Médecine RTH Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, France, ²Service de Radioanalyse, Centre de Médecine nucléaire, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France.

*To whom correspondence should be addressed E-mail: luppi@sommeil.univ-lyon1.fr

Abstract

Evidence in humans suggests that limbic cortices are more active during rapid-eye-movement (REM or paradoxical) sleep than during waking, a phenomenon fitting with the presence of vivid dreaming during this state. In that context, it seemed essential to determine which populations of cortical neurons are activated during REM sleep. Our aim in the present study is to fill this gap combining gene expression analysis, functional neuroanatomy and neurochemical lesions in rats. Here we find in rats that, during REM sleep hypersomnia compared to control and REM sleep deprivation, the dentate gyrus, the claustrum, the cortical amygdaloid nucleus, the medial entorhinal and retrosplenial cortices are the only cortical structures containing neurons with an increased expression of Bdnf, FOS and ARC, known markers of activation and/or synaptic plasticity. Further, the dentate gyrus is the only cortical structure containing more FOS-labeled neurons during REM sleep hypersomnia than during waking. Combining FOS staining, retrograde labeling and neurochemical lesion we then

provide evidence that FOS overexpression occurring in the cortex during REM sleep hypersomnia is due to projections from the supramammillary nucleus and the claustrum.

Our results strongly suggest that only a subset of cortical and hippocampal neurons are activated and display plasticity during REM sleep by means of ascending projections from the claustrum and the supramammillary nucleus. They open the way to future studies for identifying the function of REM sleep in particular with regards to dreaming and emotional memory processing.

Introduction

It is well accepted that during rapid eye movement sleep (“REM sleep” also called paradoxical sleep, PS) characterized by vivid dreaming, the cortical activity is closer to that occurring during waking (W) than during Non-REM sleep (NREM sleep or slow wave sleep) (1). Indeed, spectral analysis of EEG recordings revealed that both REM sleep and W are characterized by the presence of theta and fast gamma oscillations in contrast to NREM sleep during which sigma (spindles) and slow delta oscillations predominate (2). Further, global brain metabolism is in a similar range during W and REM sleep while it strongly decreases during NREM SLEEP (3). Unit recordings confirmed that the discharge rate of neocortical neurons is higher both during REM sleep and W than during NREM sleep (4, 5). However, a number of studies indicate that cortical activity and the subcortical pathways at its origin are not strictly identical during W and REM sleep. Indeed, significant increase in cerebral blood flow has been found in humans in specific brain areas including thalamic nuclei, limbic and paralimbic areas, and posterior cortices during REM sleep compared to quiet W (3, 6, 7). In contrast, the inferior and dorsolateral prefrontal cortices were found deactivated (3, 6, 7). A few studies examined so far the state of the cortex during REM sleep in animals. It has first been confirmed, using C14 deoxyglucose or FOS immunohistochemistry in cats, that the cingulate cortex, the hippocampus and the amygdala are more active during REM sleep than W (8, 9). In addition, an increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP), phospho-mitogen-activated protein kinase (pMAPK), and phospho-cAMP response element-binding protein (pCREB) which are required for consolidation of hippocampus-dependent memory has been observed in CA1 and the dentate gyrus during REM sleep compared to W and NREM sleep (10). It has also been reported that the expression of zif-268, a synaptic plasticity-related gene, was increased in the cerebral cortex and the hippocampus during REM sleep following exposure to an enriched environment (11). Finally, the induction of hippocampal long-term potentiation (LTP) during W in rats leads to an upregulation of zif-

268 gene expression in the amygdala, entorhinal, and auditory cerebral cortices during the first REM sleep episodes after LTP induction and reaches somatosensory and motor cerebral cortices as REM sleep recurs (12). Besides, the mechanisms responsible for the cortical and hippocampal activation during REM sleep are not well known. The current hypothesis is that cortical activation during REM sleep is induced by direct projections of the cholinergic neurons in the basal forebrain as well as by indirect projections of the cholinergic neurons in the laterodorsal and pedunculopontine nuclei and the glutamatergic neurons in the sublaterodorsal tegmental nucleus via the intralaminar thalamic nuclei (13). In contrast, the mechanisms responsible for cortical activation during W are quite well accepted. It has indeed been shown that the activation of the cortex during W is conjointly due to the cortical and thalamic projections of the basal forebrain and tegmental cholinergic neurons and those of the noradrenergic, serotonergic, histaminergic and hypocretin neurons (13, 14). In summary, although a number of studies indicate that cortical activity is different during REM sleep from that occurring during W, due to differential regional activation and functional connectivity (3), the identification of the populations of cortical neurons involved and of the subcortical pathways responsible remained to be elucidated.

To fill this gap, we first combined the study of gene expression in the cortex and the hippocampus using cDNA microarrays and quantitative real-time PCR in control, REM sleep deprived and REM sleep hypersomniac rats. We then mapped, at the cellular level, the distribution of the product (mRNA or protein) of four genes with an expression increased during REM sleep hypersomnia compared to REM sleep deprivation and control, using immunohistochemistry and in situ hybridization. Finally, combining retrograde tracing and neurochemical lesion, we identified the subcortical structures potentially responsible for the increased expression of these genes in the cortex and hippocampus during REM sleep hypersomnia.

Results

Cortical gene expression modified by REM sleep deprivation and hypersomnia

We first compared global gene expression in rats subjected to 78h of REM sleep deprivation, rats allowed to recover for 6h after such deprivation and control rats sleeping normally (Fig.1H)(n=12 rats per condition). In the 6h preceding euthanasia, REM sleep quantities were significantly different between conditions ($p < 0.0001$ RSC vs RSD and RSD vs RSR,

$p=0.0094$ RSC vs RSR, Mann Whitney). REM sleep constituted 2.7 ± 2.6 % of the total time in the RSD group, 29.6 ± 1.8 % in the RSR group, and 15.5 ± 2 % in the RSC group. There was also a significant difference in the time spent in W in RSD (65.8 ± 0.5 %) as compared to RSC (39.7 ± 1.6 %) and RSR (28.9 ± 1.8 %) rats ($p<0.0001$ RSC vs RSD, $p=0.0094$ RSC vs RSR, $p<0.0001$ RSD vs RSR, Mann Whitney). NREM sleep amounts were marginally modified among conditions (RSD: 31.5 ± 2.8 %, RSR: 41.6 ± 1.7 %, and RSC: 44.8 ± 1.8 %)($p=0.013$ RSC vs RSD, $p=0.3263$ RSC vs RSR and $p=0.0495$ RSD vs RSR).

The comparison of the gene expression level among the three experimental conditions revealed that the expression of 103 (68 identified genes and 35 expressed sequence tags (ESTs)) and 75 (51 genes and 24 ESTs) transcripts was modified by the experimental protocol in the hippocampus and cortex, respectively (see Table S1). Only 23 of the 178 modified transcripts were common between the two brain structures. In the hippocampus, a majority of the transcripts displayed an increased expression after REM sleep hypersomnia, compared to control and/or REM sleep deprivation conditions (Table S1). In contrast, in the cortex most of them displayed an increase in expression after REM sleep deprivation compared to the control condition (Table S1). The microarray results were confirmed for 9 genes (Bdnf, Arc, Fos, Cox2, Homer1a, Gpd1, Sgk, Zif-268 and Sult1a1) by quantitative real-time PCR run on hippocampal and cortical RNA extracts of 18 rats (6 per condition) from the first series of experiments (Figs. 1 and S1). Since our aim was to identify the genes positively linked with REM sleep, we then focused our analysis on the functional role of the genes with an increased expression during REM sleep hypersomnia using Gene Ontology (GO) database (15), DAVID (the database for annotation, visualization and integration discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) and an extensive literature search. This analysis shows that a large number of the genes with an increased expression during REM sleep hypersomnia in the hippocampus and the cerebral cortex are involved in synaptic plasticity, nervous system development, signal transduction and transcription regulation. The expression of eleven and 4 genes involved in synaptic plasticity and long-term potentiation is increased during REM sleep hypersomnia in the hippocampus and the cortex, respectively. The genes with an expression increased in the hippocampus were brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) (Fig.1A), activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc)(Fig.1B), FBJ osteosarcoma oncogene (Fos), (Fig. 1C), cyclooxygenase 2 (Cox2)(Fig. 1D), early growth response (Egr1 or Zif-268), Homer1a (see Fig. S1), Egr2, Klf10 (Tieg), Nr4a1 (Nur77), Rgs2, Dusp1, Dusp6 and neuronal pentraxin II (Nptx2) (16-18). Of these genes, only Bdnf (Fig. 1E) and Nptx2

also showed increased expression in the cortex during REM sleep hypersomnia. On the contrary, five other genes including Arc (Fig. 1F), Fos (Fig. 1G) and Homer1a (Table S1 and Fig. S1) displayed an increased expression in the cortex during REM sleep deprivation. Finally, the expression of Cox2 is increased during REM sleep hypersomnia only in the hippocampal formation. We further showed that the expression of Bdnf, Arc, Cox-2 (Fig. 1A, B and D) and Zif-268 (Fig. S1) in the hippocampus and the cortical expression of Bdnf (Fig. 1E) were positively correlated with the REM sleep amounts during the 6h preceding euthanasia.

Distribution of Bdnf, ARC, FOS and COX-2 in cortical and hippocampal structures after REM sleep deprivation and hypersomnia

Based on the above findings and in order to identify the cortical and hippocampal populations of neurons activated and displaying plasticity during REM sleep hypersomnia, we examined, using in situ hybridization or immunohistochemistry, the regional expression of the products (mRNA or proteins) of three well-known related plasticity genes, namely Bdnf, Arc and Cox-2, and one gene known to be involved both in plasticity and neuronal activation, Fos.

In the hippocampus, Bdnf (Fig. 2A-C and Table S2A), ARC (Fig. 2D-F and Table S2B), FOS (Fig. 2G-I and Table S3) and COX-2 (Fig. 2J-L and Table S2C) labeling was strongly increased during REM sleep hypersomnia as compared to REM sleep deprivation and control conditions specifically in the granule cells of dentate gyrus (Fig. 2). Bdnf, ARC, FOS and COX-2 expression was not modified between control and REM sleep deprivation. In addition, Bdnf and COX-2 but not FOS and ARC labeling was increased in CA3 after REM sleep hypersomnia compared to control and REM sleep deprivation (Fig. 2). No modification was observed in CA1 for all four markers (Fig. 2 C, F, I, L and S2).

The results are more heterogeneous in the cortex. First, expression level of ARC (Fig. 3H and Table S2B) and FOS (Figs. 3L, S2 and Table S3) but not of Bdnf (Fig. 3D and Table S2A) was increased in the neocortex (auditory, motor, somatosensory and visual) and in the piriform cortex during REM sleep deprivation compared to the two other conditions. These results suggest that neurons in the sensorimotor neocortical areas are activated and express some of the plasticity proteins during REM sleep deprivation and, conversely, might be deactivated during REM sleep hypersomnia. Second, in a small number of cortical limbic structures, namely the retrosplenial (Fig. 3 B, F and J) and medial entorhinal cortices, the claustrum (Fig. 3 C, G and K) and the cortical amygdaloid nucleus, Bdnf, ARC and FOS

(Figs. 3D, H, L and S2, Tables S2 and S3) expression was significantly higher in REM sleep hypersomniac rats compared to control and higher than or similar to REM sleep deprived rats. The results are more heterogeneous in the anterior cingulate cortex than in the other cortices. Indeed, *Bdnf* labeling (Fig. 3A) was increased in the REM sleep hypersomniac group compared to the other two groups and FOS labeling was increased both in the RSD and RSR groups compared to control rats (Fig. 3I). Finally, ARC labeling (Fig. 3E) was increased specifically during REM sleep deprivation compared to REM sleep hypersomnia and control groups (Figs. 3D, H, I and S3, Tables S2 and S3).

Altogether, these results indicate for the first time that the expression of genes and related proteins classically involved in neuronal activation and plasticity is increased only in a few limbic cortical structures during REM sleep hypersomnia.

Cortical distribution of FOS+ neurons during waking compared to REM sleep hypersomnia

To determine whether cortical structures are similarly activated during W and REM sleep, as current hypotheses suggest (see Introduction), we then mapped out FOS+ cells in the cortex in an additional group of rats awake during 3h (n=4) and compared the results with those obtained in the REM sleep deprived and hypersomniac groups. In line with a previous report (19), nearly all cortical and hippocampal structures contained a very large number of FOS+ neurons after W. FOS+ cell numbers were significantly above those counted after REM sleep deprivation and hypersomnia in most cortical structures, in particular the sensorimotor cortices (Figs. 4, S2 and Table S3). The dentate gyrus was the only cortical structure containing significantly more FOS+ neurons during REM sleep hypersomnia than during W, in sharp contrast with the CA1 and CA3 fields (Fig. 4 A and D). In addition, the number of FOS+ neurons was similar during REM sleep hypersomnia and W in the cortical amygdaloid nucleus (Fig. 4 C), the claustrum, and the medial entorhinal cortex (Figs. 4D-F, S2 and Table S3). Altogether, these results strongly suggest that cortical activation during REM sleep hypersomnia is limited to very few limbic cortical structures compared to W.

Subcortical structures activating the cortex during REM sleep

We then labeled the neurons projecting to the limbic cortical structures and expressing FOS during REM sleep hypersomnia. To this aim, we injected two retrograde tracers, fluorogold (FG) or cholera toxin B subunit (CTb), in three cortical limbic structures, namely the dentate gyrus, retrosplenial and anterior cingulate cortices (n=4 for each), and subjected all rats to

REM sleep deprivation followed by REM sleep hypersomnia. After CTb injection into the dentate gyrus (Fig. 5A), the only structure displaying a substantial number of double-labeled cells (10.6 ± 4.80 CTb+/FOS+) was the lateral part of the supramammillary nucleus (SUML)(Fig. 5 B, J and Table S4), suggesting that neurons in this nucleus projecting to the dentate gyrus are activated during REM sleep. After FG injection in the anterior cingulate cortex (Fig. 5D), a large number of double-labeled cells were observed in the claustrum (71.0 ± 23.5 CTb+/FOS+) and a small number in the SUML (7.6 ± 1.90 CTb+/FOS+)(Fig. 5 E, F, J and Table S5). After CTb injection in the retrosplenial cortex (Fig. 5G), a substantial number of double-labeled cells were only observed in the claustrum (18.5 ± 4.1 CTb+/FOS+)(Fig. 5 I, J and Table S5). After all tracers injections, the thalamic nuclei, the basal forebrain, the lateral hypothalamic area and the laterodorsal and pedunculopontine nuclei, previously thought to be responsible for cortical activation during REM sleep (13), contained retrogradely labeled cells but, surprisingly, none or only a few of them were also FOS+ (Fig. 5 C, H, J). These findings suggest that the neurons responsible for the limbic cortical activation during REM sleep hypersomnia are located in the SUML and the claustrum. In addition, we found out that the SUML contained twice as many FOS+ neurons during REM sleep hypersomnia than after 3h of W (Table S6). In contrast, the medial part of the SUM (SUMM) contained a lower number of FOS neurons not significantly different between the RSR and the waking groups (Table S6). In addition, in agreement with a previous study (20), a large number of anterogradely labeled fibers was observed in the dentate gyrus in close vicinity of FOS+ neurons after CTb injection in the SUML in REM sleep hypersomniac rats (Fig. 5K). Moreover, the basal forebrain and the intralaminar thalamic nuclei contained only a few FOS+ neurons after REM sleep hypersomnia while they contained a large number of such cells after 3h of W (Table S6).

Altogether, these results strongly suggest that, during REM sleep, neurons in the SUML activate and induce plasticity in a subpopulation of dentate gyrus granule cells. The SUML would only partly contribute to the activation and plasticity of the neurons of the anterior cingulate cortex and not of those of the retrosplenial cortex. Rather, the claustrum would be the main subcortical structure activating these two cortices during REM sleep.

Effect of the lesion of the supramammillary nucleus on the cortical activation during REM sleep

To test the hypothesis of a key role of the SUML in the dentate gyrus activation and plasticity occurring during REM sleep hypersomnia, we compared the sleep-wake cycle, EEG power

spectrum and distribution of the FOS⁺ neurons in the cortex of rats subjected to REM sleep deprivation and hypersomnia after bilateral iontophoretic injections of ibotenic acid or control NaCl injections in the SUM (n=4 for each condition). The SUM was left intact in the control animals while it was entirely lesioned in those injected with ibotenic acid (Fig. 6 A, B). The amounts of W, NREM and REM sleep were not significantly different between the two groups of rats during baseline recording (Fig. S3A) and the 6h of REM sleep hypersomnia (Fig. 6C). EEG power spectrum analysis revealed that theta and sigma power during REM sleep episodes were slightly but significantly decreased and increased in the lesioned rats, respectively, compared to the sham-operated rats (Figs. 6D, S3B). In contrast, no modification was seen in the EEG during W and NREM sleep (Fig. S3 C, D). The number of FOS⁺ neurons was strongly decreased in the dentate gyrus during REM sleep hypersomnia in the lesioned rats compared to sham rats. In contrast, the number of FOS⁺ neurons in the other limbic structures with an increased number of FOS⁺ neurons was not significantly modified after lesion (Fig. 6 E, F and Table S7). These observations strongly suggest that neurons localized in the SUML are specifically responsible for the activation of granule neurons of the dentate gyrus during REM sleep hypersomnia.

Discussion

In the present study, we report that the expression of a large number of genes involved in neuronal activation and plasticity is increased in a restricted number of limbic cortical structures during REM sleep hypersomnia. We further show that the dentate gyrus is the only cortical structure containing more FOS-labeled cells during REM sleep hypersomnia than during waking. By combining retrograde tracing with FOS staining after REM sleep hypersomnia, we additionally demonstrated that the activation of limbic cortical structures during REM sleep hypersomnia might be induced by projections from the SUML and the claustrum (Fig. 7). The neurotoxic lesion of the SUML confirmed that this nucleus is responsible for the increased FOS expression in granule cells of the dentate gyrus during REM sleep hypersomnia.

Methodological considerations

To determine the modifications of gene expression occurring in the cortex during REM sleep and the subcortical pathways responsible, we manipulated REM sleep quantities using the flowerpot method. Such deprivation method has been extensively and successfully used in the

past to induce a quite specific and complete suppression of REM sleep and to obtain a strong rebound in REM sleep (21-37). However, it also induces chronic stress, deprivation of deep NREM sleep and REM sleep is only present one third of the time during the recovery. It is therefore likely that some of the results obtained are not specifically linked to the state of REM sleep per se and do not reflect what occurs during basal REM sleep but are rather due to other physiological modifications induced by the protocol,. Therefore, our results need to be confirmed in the future by other approaches. Nevertheless we believe that they reveal for the first time a network of cortical neurons likely displaying activation and plasticity during REM sleep. Indeed,, electrophysiological recordings already performed in several structures containing FOS+ neurons in the REM sleep recovery condition confirmed the presence of neurons with an increased activity specifically during basal REM sleep (38-45). In addition, it has recently been shown that the expression of FOS in cortical neurons in FOS/GFP transgenic mice is associated with elevated spontaneous firing activity compared to neighboring FOS/GFP negative neurons (46). Such results strongly suggest that the expression of FOS reflects an increased firing activity of neurons. However, it does not rule out the possibility that certain populations of neurons are active during REM sleep but did not express FOS during REM sleep hypersomnia since it has been reported previously that some brain regions do not express Fos after any treatments (47).

State of the hippocampus during REM sleep

Our microarray data shows that the expression of numerous genes previously involved in long-term potentiation and synaptic plasticity is increased in the hippocampus during REM sleep hypersomnia compared to control and REM sleep deprivation. It might however be argued that such modification is not linked to REM sleep since the expression of these genes is not decreased during REM sleep deprivation compared to control. One explanation could be that the expression of these genes decreased at the beginning of the REM sleep deprivation and then recovered because of the semi-chronic state of the deprivation. Indeed, most of these are early genes which are known to have an increased expression during acute but not long-lasting stimuli (48). These genes include transcription factors like Fos, Zif-268, Egr2, Klf10 (Tieg), Nr4a1 (Nur77) (49) and genes regulating dendritic spines density and postsynaptic strength such as Homer1a, Bdnf, Arc, Rgs2, Ptgs2 (Cox2) (17, 18, 50). Bdnf, Fos, Dusp1, Dusp6 and Nr4a1 are also involved in the mitogen-activated-protein kinase (MAPK) signaling pathway which is required for long-term potentiation (LTP)(DAVID database) (51). In order to identify the hippocampal neurons with an increased expression of these genes during REM

sleep hypersomnia, we quantified in CA1, CA3 and the dentate gyrus the labeling of Bdnf, ARC, COX2 and FOS. Here we show that the expression of Bdnf, ARC, FOS and COX2 is specifically increased in the dentate gyrus during REM sleep hypersomnia. COX-2 and Bdnf expression is also increased in CA3. The distribution of the granule cells expressing Bdnf, ARC, FOS and COX-2 is apparently similar, although a technically challenging multiple labeling would be necessary to demonstrate that they colocalize in the same granule cells. Consistent with our results, it has been previously reported that the expression of zif-268, a synaptic plasticity-related gene also revealed by our microarray study, is increased in the dentate gyrus during REM sleep following exposure to an enriched environment (11). In addition, an increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP), phospho-mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phospho-cAMP response element-binding protein (CREB) which are required for consolidation of hippocampus-dependent memory has been observed in the dentate gyrus during REM sleep compared to W and NREM sleep (10). Further supporting our results, it has been shown using C14-deoxyglucose that the dentate gyrus uses more glucose during basal REM sleep than during W (52). Moreover, Montgomery et al. (53) found by coherence analysis that dentate/CA3 theta and gamma synchrony was significantly higher during REM sleep compared with active W and that, in contrast, gamma power in CA1 and CA3–CA1 gamma coherence showed significant decreases during REM sleep. It has been proposed that an increase in local field potential synchronization may facilitate synaptic plasticity in agreement with the present results (53). Further, it has recently been shown that the firing rate of CA1 pyramidal cells and interneurons decreases during REM sleep (54). In view of these and our data, we propose that a subset of granule neurons of the dentate gyrus is strongly activated, exhibits synaptic plasticity specifically during REM sleep and induces a slight activation and synaptic plasticity in CA3 but not in CA1 neurons. Additional experiments are necessary to demonstrate that the increase in gene expression in the dentate gyrus is related to an increase in neuronal activity and synaptic plasticity during REM sleep episodes.

State of the sensorimotor cortex during REM sleep

In the neocortex, our results show that the expression of genes implicated in neuronal plasticity and development such as Bdnf and Nptx2 (55, 56) is increased during REM sleep hypersomnia while the expression of genes involved in membrane depolarization and synaptic activity such as Homer1a, Arc, Fos, Nr4a1 and Vgf (49) on the contrary is increased during REM sleep deprivation. Fos, Cacna1h, Cacnb, Dusp1 and Nr4a1, with an increased

expression during REM sleep deprivation, are also involved in the MAPK signaling pathway (DAVID database). It has been previously shown that the expression of most of these genes is increased in the neocortex after 8h of total sleep deprivation and decreases during sleep (57, 58). These results are at the basis of the synaptic homeostasis hypothesis proposing that synaptic potentiation occurs during W while global downscaling of synaptic strength occurs during sleep (59). In our study, we showed that, the expression of ARC and FOS but not Bdnf is increased during REM sleep deprivation in most neocortices in particularly the sensorimotor ones. These results fit with our microarrays results and suggest that synaptic downscaling might occur during REM sleep in the somatosensory cortices. They are also supported by multiunit recordings, showing that spontaneous activity of neurons localized in the auditory and motor cortices decreases during both NREM and REM sleep compared to W (60).

State of the limbic cortical areas during REM sleep

We demonstrate here that the expression of Bdnf is increased specifically during REM sleep hypersomnia compared to REM sleep deprivation and control in the claustrum, the cortical amygdaloid nucleus and the medial entorhinal, anterior cingulate and retrosplenial cortices. ARC and FOS expression is also increased in most of these structures during REM sleep hypersomnia compared to control. However, ARC and FOS expression is also increased during REM sleep deprivation. The decoupling between Bdnf, ARC and FOS in the neocortex does not occur in the hippocampus. It suggests that Bdnf plays a differential role in cortical neurons during REM sleep than ARC and FOS. These results have not been reported before. It has indeed only been reported previously in cats that the number of FOS-labeled neurons localized in the cingulate gyrus during pharmacologically induced REM sleep hypersomnia is larger than during W (9). Using the C14-deoxyglucose method, it has also been shown that the cingulate cortex uses more glucose during basal REM sleep than during W (8, 52). Further, in human, cerebral blood flow is increased specifically during REM sleep compared to quiet W in the anterior cingulate gyrus, the hippocampus and the entorhinal cortex (3). From these and our results, we propose that neurons localized in the claustrum, cortical amygdaloid nucleus and the medial entorhinal, anterior cingulate and retrosplenial cortices are strongly activated during REM sleep in contrast to those belonging to the other cortical structures. Further, the increased expression of ARC and Bdnf, two markers of synaptic plasticity might suggests that synaptic plasticity takes place in these limbic areas during REM

sleep. Unit recordings during REM sleep and challenging triple immunohistochemical labeling are however necessary to confirm such an hypothesis.

Cortical activation during REM sleep is limited to a few limbic structures compared to waking

We found out that after 3h of waking, most cortical areas contain many more neurons than after 6h of REM sleep hypersomnia excepting the dentate gyrus which contain significantly less FOS+ neurons. These results strongly suggest that the dentate gyrus is more activated during REM sleep than during waking whereas a few numbers of limbic cortices are similarly activated both during REM sleep and waking. Such assumption remains to be confirmed by unit recording although it is supported by previous works showing that neurons with an increased activity specifically during REM sleep have been recorded in the structures containing neurons expressing FOS after REM sleep rebound (41, 61). However, we cannot rule out the possibility that FOS expression would be more widespread in the cortex if the animals did spend 100% of their time in REM sleep during the last three hours like the waking group or if the animals would have been exposed to strong stimuli or a learning protocol during REM sleep deprivation. One might also argue that the extensive FOS labeling obtained by our waking protocol is more widespread than after spontaneous waking and is due to exposure to a new environment. This seems however unlikely since a widespread expression of FOS was previously reported in the cortex after spontaneous waking (19, 62, 63).

The supramammillary nucleus and the claustrum are key structures for cortical activation during REM sleep

Previous data indicate that cortical activation during REM sleep is induced by projections from cholinergic neurons of the basal forebrain and glutamatergic neurons of the intralaminar thalamic nuclei (13). However, in our study, after injections of retrograde tracers into the dentate gyrus, the retrosplenial or anterior cingulate cortices, a large number of labeled neurons was observed in the intralaminar thalamic nuclei and the basal forebrain but these neurons did not express FOS during REM sleep hypersomnia. In contrast, many neurons of these structures expressed FOS during W suggesting that they play a role in cortical activation during this state.

In our experiments, the claustrum and/or the SUML were the only structures containing neurons activated (FOS+) during REM sleep hypersomnia and projecting to the anterior

cingulate and retrosplenial cortices and the dentate gyrus. Our results confirm the presence of FOS+ neurons in the SUML during REM sleep hypersomnia (9, 23, 31) and further show for the first time that they strongly project to the dentate gyrus.

Finally, we demonstrated that SUM lesions cause a dramatic decrease in the number of FOS+ neurons in the dentate gyrus during REM sleep hypersomnia. These results suggest that granule cells of the dentate gyrus are activated during REM sleep by a projection from neurons located in the SUML. It has previously been shown that SUML neurons projecting to the dentate gyrus are glutamatergic (64, 65). However, these neurons also express markers of GABAergic transmission indicating that they display a unique phenotype for GABAergic and glutamatergic transmission (65). From these results, it has been hypothesized that the projection of the SUM could simultaneously hyperpolarize the soma and depolarize the dendrites of dentate granule neurons (65). Based on these and our results, we propose that the release of glutamate on the dendrites of a subset of granule neurons in the dentate gyrus during REM sleep induces, in addition to Fos, the expression of genes involved in synaptic plasticity like Bdnf, Arc and Cox2 and others revealed by our microarray study.

In addition, we found out that the SUM lesions induced a slight but significant decrease in theta power during REM sleep but not during NREM sleep and W. In agreement with this last observation, it has been previously reported that lesion or inactivation of the SUML does not induce a decrease in theta power during W (66-68). These results suggest that the SUML-dentate gyrus pathway plays a minor role in theta rhythm generation during REM sleep in contrast to the cortical projection from the basal forebrain. Indeed, lesions of the basal forebrain are well-known to induce a near complete suppression of theta during REM sleep (69).

Our results further strongly suggest that the neuronal activation and synaptic plasticity potentially occurring during REM sleep hypersomnia in the anterior cingulate and the retrosplenial cortices would be due to a projection from neurons of the claustrum (Fig. 7). Since the claustrum is known to project to almost all cortical structures (70), the same neurons could also be responsible for the activation of the cortical amygdaloid nucleus and the medial entorhinal cortex. Additional electrophysiological, inactivation or lesion studies are necessary to confirm such a hypothesis although this might be a difficult task since the claustrum is a narrow nucleus with a very long rostro-caudal extension.

REM sleep and emotional memory

Interestingly, the cortical structures with an increased expression of plasticity related genes during REM sleep hypersomnia revealed here overlap the network that regulates emotional learning and memory. The anterior cingulate and retrosplenial cortices have indeed been involved in cognitive and emotional processing and in the genesis and recall of complex and coherent scenes or events (71). On the other hand, the dentate gyrus is involved in pattern separation and/or recombination of previous memories to facilitate novel inferences (72). In addition, the claustrum integrates varied types of information that underlie conscious perception and cognition (70). Finally, the SUML has been involved in emotional memory (73, 74). Besides, several studies in humans and rats suggest a preferential role for REM sleep in modulating affective brain processes and in restoring optimal post-sleep affective reactivity (75). In view of these and our results, it is tempting to propose that the changes in gene expression seen in the present study during REM sleep hypersomnia in a network of limbic cortical neurons play a crucial role in cognitive and emotional information processing.

Conclusions

Our results provide evidence for the first time that selective populations of neurons from the dentate gyrus and a subset of limbic cortices are activated and display synaptic plasticity during REM sleep. It opens the way for the identification of the function of REM sleep by means of behavioral and electrophysiological studies combined with local inactivation of the subcortical pathways revealed.

Materials and Methods

All experiments were conducted in accordance with the French and European Community guidelines for the use of animals in research and approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon 1 (protocols BH 2006-09 and BH 2006-10). Sprague-Dawley rats were housed individually and placed under a constant light/dark cycle (light on from 7:00 AM to 7:00 PM).

Animals and surgery

Sprague-Dawley male rats (6-7 weeks old, 260-300 g, Charles River, L'Arbresle France) were implanted with electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) electrodes

under chloral hydrate anesthesia (400mg/kg, i.p). Rimadyl (120mg/kg i.m) and lidocaine injected subcutaneously were used for analgesia. Two and one stainless steel screws were fixed in the parietal and frontal parts of the skull, respectively, while the reference electrode for unipolar EEG recording was fixed in the occipital part. Two wire electrodes were inserted into the neck muscles for bipolar EMG recordings. All leads were connected to a miniature plug (Plastics One Inc.) that was cemented on the skull.

Microarray

Thirty-six rats, implanted for EEG and EMG recordings as described above were used: 12 control animals kept in their home cage, 12 rats deprived of REM sleep, and 12 rats allowed to recover from the deprivation. All rats were decapitated under pentobarbital anesthesia (150mg/kg i.p) and their whole brain was removed

Immunohistochemistry and “in situ” hybridization

28 male rats (6-7 weeks old, 260-300 g, Charles River, l'Arbresle, France) were used. Eight rats kept in their home cage were used as control, 8 rats were deprived of REM sleep and eight rats were allowed to recover from REM sleep deprivation (see below). Half of the rats from each group were implanted for EEG and the EMG recordings. Finally, eight rats were submitted to the waking protocol (see below), All rats were perfused at the end of the protocol (see below).

Tracer injections

Rats (6-7 weeks old, 260-300 g, Charles River, l'Arbresle, France) were anesthetized as described above and placed in a stereotaxic apparatus. Glass micropipettes (4-5µm O.D.) were backfilled with a 1% solution of cholera toxin B subunit (CTb; List Biological Lab., diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 6.0) for injection in the dentate gyrus (n=4), the retrosplenial cortex (n=4) and the supramammillary nucleus (n=4). The four animals with an injection in the retrosplenial cortex also received a fluorogold (FG; Fluoprobe, diluted in distilled water at 8mmol/L and pH 6) injection in the anterior cingulate cortex, a retrograde tracer with similar sensitivity compared to CTb to decrease the number of animals used. The pipettes were lowered from the surface of the brain to a depth of -3.5mm for the dentate gyrus (coordinates: AP -3.3 mm to Bregma, ML -0.8 mm lateral to midline), -1.4 mm for the retrosplenial cortex (coordinates: AP -7mm to Bregma, ML +1mm lateral to midline), -2.2mm for the anterior cingulate cortex (coordinates, AP +1 mm to Bregma, ML -0.8 mm lateral to

midline), and -8.3mm for the supramammillary nucleus (coordinates: AP -4.5mm to Bregma, ML +0.6mm lateral to midline). CTb and FG were ejected during 10 min with a pulsed positive current (7 s on, 7 s off) of +2 μ A for the dentate gyrus and a continuous current of +4 μ A for the other cortices. The animals were then implanted for EEG and EMG recordings as described above and submitted to the paradoxical sleep deprivation and recovery procedure (see below) before being perfused.

Lesions

Male Sprague-Dawley rats (6-7 weeks old, 260-300 g, Charles River, l'Arbresle France) were anesthetized as described above and placed in a stereotaxic apparatus. The lesions were made bilaterally in 4 rats by passing in each supramammillary nucleus a 10 μ A continuous current for 10 min through a micropipette containing ibotenic acid (25mmol/L in distilled water adjusted at pH 8; Tocris, See Figure 6 for the extent of the lesions in each animal). Four sham rats were subjected to the same protocol with a micropipette containing 0.9% NaCl. All animals were then implanted for EEG and EMG recordings as described above and submitted the paradoxical sleep deprivation and recovery before being perfused.

Polygraphic recordings

Animals recovered from surgery during one week in their home cage (a Plexiglas jar) before being habituated to the recording conditions (recording chamber and cable habituation) for 4 days. Rats were connected to a cable attached to a slip-ring commutator to allow free movements of the animal within the jar. EEG and EMG recordings were amplified (MCP-PLUS, Alpha-Omega Engineering) and collected on a computer via a CED interface using the Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Sampling frequency for polygraphic recordings was 520.8 Hz. Their sleep-waking cycle was then recorded during 2 days (baseline).

REM sleep deprivation procedure

REM sleep deprivation was performed using the flowerpot method that has previously been shown to induce a fairly selective deprivation of REM sleep in rats (21, 23). Rats were divided in 3 groups: control (RSC), deprived of REM sleep for 75 or 78 h (RSD) and rats allowed to recover for 3 or 6 h after such deprivation (RSR). The RSC animals remained in their jar on a bed of woodchip in the recording room throughout the experiment. After 48 h of baseline recordings, RSD and RSR rats were placed at 10:00 AM in a jar with 2-3 cm of water

at their bottom and containing 3 platforms (6.2 cm diameter, 7-12 cm height) spaced 7-8 cm apart. For the Bdnf and ARC experiments, animals were put on a single platform. During deprivation, the animal could enter NREM but not REM sleep, because of the loss of muscle tone occurring at REM sleep onset. During RSD, food and water were available ad libitum and the container was cleaned daily. The third day, RSR animals were removed from their cages at 10:00 A.M. and put on a dry bed of woodchips in recording jars to allow REM sleep hypersomnia. Animals were perfused at 1:00 (for the Bdnf and ARC labeling) or 4:00 PM (for the microarray and the FOS, COX2 experiments) under deep pentobarbital anesthesia (Ceva sante animal, 150mg/kg, i.p.). The RSR rats used for the Bdnf and ARC experiment were perfused 3 hours and the other RSR rats 6 hours after the onset of REM sleep hypersomnia.

Waking protocol

The waking protocol was used to induce a continuous period of waking during three hours. This procedure has been described in detail elsewhere (76). Briefly, waking animals (W) were placed in a square 1.5 m x 1.5 m x 0.5 m black open field with numerous colored plastic toys. The light intensity above the open field was the same as that of the animal room. The animals had free access to water and food. The experimenter continuously observed them and the toys were moved when the animals seemed to get sleepy. After 3 h (1–4 PM), all animals were perfused for histology.

Techniques

Microarray: Labeling, Hybridization, Data Analysis

In the thirty-six rats used (12 RSC, 12 RSD, 12 RSR animals) the part of the brain rostral to the optic chiasm was eliminated and the right cortex and hippocampal formation were dissected and stored at -80°C. Total RNA was isolated from the cortex and hippocampal formation of each animal by using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) and RNase-free DNase set (Qiagen) to eliminate DNA contamination according to the manufacturer's instructions. An equal mass amount of total RNA from the cortex and hippocampal formation was pooled from two sets of 6 rats from each experimental group (RSC, RSD, RSR; 36 µg/pool). Pool RNAs were then sent to the Affymetrix core facility located at the IGBMC in Strasbourg (France) to be hybridized on GeneChip rat 230 2.0 with the standard Affymetrix protocol (Expression 10 Analysis Technical Manual, ref 701021 rev.5, Affymetrix). Arrays were scanned using the GeneChip Scanner 3000 and analyzed with Affymetrix GeneChip Operating software (GCOS) version 1.2 using default analysis settings and global scaling as

normalization method. The trimmed mean target intensity of each array was arbitrarily set to 100. Significant transcripts expression changes were determined with paired nonparametric test (Microarray Suite 5.0, Affymetrix). For each intergroup comparison (RSC vs RSD, RSC vs RSR, RSD vs RSR), transcript expression level was considered as modified in the hippocampus or the neocortex between two experimental conditions when it was designed as decreased (D) or increased (I) for both replicas. Based on this analysis, we choose to classify these transcripts in four groups listed in supplementary Table 1: increased (I-RSD) or decreased (D-RSD) expression during RSD compared to RSC, increased (I-RSR) or decreased (D-RSR) expression during RSR compared to RSD and/or RSC (Table S1). The transcripts with a signal intensity inferior to 50 in all the experimental conditions were discarded. The transcripts with a significant expression change between two conditions but a log ratio inferior to 0.4 were also eliminated from the list. Since our aim in the present study was to determine the genes positively linked with REM sleep, we focused our analysis on the genes with a strong increased expression during RSR compared to RSC and/or RSD. All the genes of this type belonged to the I-RSR category.

Real-Time qPCR

Real-time qPCR was performed with a light cycler system (Roche Diagnostic). Reverse transcription reactions were performed, for each animal (n=18) and each pool (n=3; RSC, RSD, and RSR) of one of the two series of animals used for the microarrays, with the M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions (1 µg total RNA). Reverse primers (listed below), 15 µl Mix prepared with Light Cycler Faststart DNA Master SYBR Green Kit (Roche Diagnostic) and 5 µl of cDNA to a total volume of 20 µl.

Primers used for PCR:

Annealing gene	Primer sequence
<i>βAct</i>	F : GCATTGCTGACAGGATGCAG R : CATCGTACTCCTGCTTGCTG
<i>Zif-268</i>	F : ACAGTGGCAACACTTTGTGG R : ATGTCAGTGTTGGGAGTAGG
<i>Fos</i>	F : TTGTAGTGACACCTGAGAGC R : TCCAGCACCAGGTTAATTCC
<i>Sgk</i>	F : AGTGAGAAGGAAGATGCAGG R : CTGCACACATGGGAAATACG
<i>Cox2</i>	F : CCACTTCCAACCTCAAGTTCG R : GTTTGAAAGTGTACTCCTGG
<i>Gpd1</i>	F : AGAGCAGGGAAGGGAACATC R : AGAGAAAGGGAGGGGATTCA
<i>Sult1a1</i>	F : TACACAACCATCCCCACTGA R : GTTTCCTTGGTCCCAGTA

<i>Bdnf</i>	F : GTGACAGTATTAGCGAGTGG R : TTCCTTCGTGTAACCCATGG
<i>Arc</i>	F : TCCTGCAGATTGGTAAGTGC R : CTTGATGGACTTCTTCCAGC
<i>Homer1</i>	F : ACCTATCTTCAGCACTCGAG R : GCCGTCTACACTGATTATCC
Annealing gene	Primer sequence
<i>βAct</i>	F : GCATTGCTGACAGGATGCAG R : CATCGTACTCCTGCTTGCTG
<i>Zif-268</i>	F : ACAGTGGCAACACTTTGTGG R : ATGTCAGTGTTGGGAGTAGG
<i>Fos</i>	F : TTGTAGTGACACCTGAGAGC R : TCCAGCACCAAGTTAATTCC
<i>Sgk</i>	F : AGTGAGAAGGAAGATGCAGG R : CTGCACACATGGGAAATACG
<i>Cox2</i>	F : CCACTTCCAACCTCAAGTTCG R : GTTTGAAAGTGTACTCCTGG
<i>Gpd1</i>	F : AGAGCAGGGAAGGGAACATC R : AGAGAAAGGGAGGGGATTCA
<i>Sult1a1</i>	F : TACACAACCATCCCCACTGA R : GTTTGCCTTGGTTCCCAGTA
<i>Bdnf</i>	F : GTGACAGTATTAGCGAGTGG R : TTCCTTCGTGTAACCCATGG
<i>Arc</i>	F : TCCTGCAGATTGGTAAGTGC R : CTTGATGGACTTCTTCCAGC
<i>Homer1</i>	F : ACCTATCTTCAGCACTCGAG R : GCCGTCTACACTGATTATCC

Dilution series standard curves were performed for each primer pair, using reverse transcription products from rat brain total RNA. qPCR was done for each sample condition assayed and relative quantities determined based on the equation of the line of best fit derived from the standard curve.

Immunohistochemistry

Animals were perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were postfixed for 12 h at 4 °C and then stored for 2 days at 4 °C in PB with 30% sucrose. The brains were rapidly frozen with CO₂ gas, sliced in 25 µm-thick coronal sections and stored in PB containing 0.9% NaCl, 0.3% Triton X-100 and 0.1% sodium azide (PBST-Az). They were successively incubated in (i) a rabbit antiserum to FOS (1:5,000; Oncogene, Cat# PC38 (Ab-5)) or a rabbit antiserum to ARC (1:10,000; Synaptic systems, Cat# 156 003) or a goat antiserum to COX-2 (1:1,000; Upstate, Cat# 07-693) in PBST-Az for 3 days at 4 °C; (ii) a biotinylated antirabbit or antigoat IgG solution (1:1,000 in PBST; Vector Labs, Cat# BA-1000 and BA-9500 respectively); and (iii) an ABC-HRP solution (1:1,000 in PBST; Elite kit, Vector Labs) for 90 min at room temperature. Finally, the sections were immersed in a 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB; Sigma), 0.003% H₂O₂ and 0.6% nickel ammonium sulfate to obtain a black reaction product.

FOS stained sections were re-incubated in the goat antiserum to CTb (1:100,000; Calbiochem, Cat# 227040) or in the rabbit antiserum to FG (1 : 20,000 ; US Biological, Cat# F5037) and then put in a DAB solution without nickel to obtain a brown reaction product. Controls with omission of the primary or secondary antibodies were run to check for the absence of nonspecific staining and crossreactions in the case of dual immunostaining. Specificity of the FOS antiserum was previously evaluated by direct colabeling for c-fos mRNA and abolition of specific staining in experimental and control tissue by preadsorbing the antiserum with the synthetic peptide immunogen (77). It was also previously shown that Arc immunofluorescence obtained with the ARC antiserum was abolished after transfection of short hairpin RNA against Arc (78). Finally, the same specific staining of granule cells of the dentate gyrus than the one reported in the present study was reported previously using another COX-2 antibody and COX-2 mRNA in situ hybridization (79).

Sections of the RSR-Lesion and RSR-sham rats at the level of the supramammillary nucleus were incubated in a mouse antiserum to NeuN (1: 20000; Chemicon, Cat# MAB377B), followed by an incubation in a biotinylated antimouse IgG solution (1:1000 in PBST; Vector Labs, Cat# BA-9200). Sections were then mounted and counterstained with neutral red.

In situ hybridization of Bdnf

Free-floating sections of RSC (n=4), RSD (n=4) and RSR (n=4) rats were collected and stored at -20°C in RNase-free cryoprotectant solution (0.05% DEPC, 20% glycerol, 30% ethylene glycol in 50 mM PB, pH 7.4). *Bdnf* cDNA was obtained from a recombinant plasmid containing *Bdnf* cDNA sequence (80) and linearized using SmaI or Hind III (for antisens and sens riboprobes, respectively) (New England Biolabs, USA). The antisense riboprobe contained a 467 bp fragment corresponding to bases 283–750 of the rat BDNF mRNA (GenBank accession number AY176065.1). The sens riboprobe contained the entire sequence of the BDNF mRNA (750 bp). Sens and antisens *Bdnf* riboprobes were synthesized using T3/T7 and T7/SP6 RNA polymerases, respectively. All riboprobes were transcribed using a non-radioactive RNA labeling kit (Roche Diagnostic, Germany) following manufacturer's instructions. Digoxigenin-labeled riboprobes were then stored at -20°C in hybridization buffer (see below). Sections were rinsed 3 x 10 min in a standard saline citrate solution (2SSC) containing 0.2% RNase inhibitor (Protect RNA RNase inhibitor, Sigma-Aldrich). Then, sections were incubated overnight at 65°C in a wet chamber, in the hybridization buffer (consisting of 150 mM NaCl, 8 mM Tris- HCl, 1 mM Tris-Base, 6 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, 50% formamide, 10% dextran sulphate, yeast tRNA (Sigma type

III, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich), 0.02% ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone) and containing 1.89 µg/ml of Bdnf riboprobe. After hybridization, the sections were rinsed 2 x 10 min at 65°C in a 1SSC solution containing 0.1% Tween-20 and 50% formamide and treated for 15 min at 37 °C with 10 mg/ml RNase A (USB, OH, USA) in a 10 mM Tris solution (pH 8.0) containing 1 mM EDTA and 500 mM NaCl. Sections were then rinsed 3 x 10 min at room temperature in 10 mM PB containing 0.9% NaCl and 0.3% Triton-100X (PBST). For immunohistochemical detection of digoxigenin, the sections were incubated overnight at room temperature with a digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostic) diluted 1:2,000 in PBST containing 0.2% blocking reagent (Roche Diagnostic). After incubation, the sections were washed 2 x 10 min in PBST, 10 min in PBS and then in a buffer containing 100 mM Tris (pH 9.5), 100 mM NaCl and 50 mM MgCl₂. The sections were developed at 37°C for nearly 4 h in the same buffer containing nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) diluted 1/50 from the stock solution (Roche Diagnostic). The reaction was stopped when the ratio signal/background was optimal. Finally, the sections were mounted on glass slides, dried and coverslipped with Vectamount (Vector Laboratories).

Analysis

Analysis of the sleep wake states

The episodes of each vigilance state were scored during the last 3 or 6 hours before euthanasia in all animals used for the microarrays, the qPCR, the *Bdnf* staining, the RSR-Sham and RSR-Lesion rats and the RSR animals with a retrograde tracer injection by using a 10-sec sliding time window according to the criteria described in detail elsewhere (21, 23). State classification was done by a visual check of polygraphic signals. Waking was characterized by a desynchronized (activated) low-amplitude EEG accompanied by a sustained EMG activity; NREM sleep was distinguished by high-voltage slow waves (1.5– 4.0 Hz) and spindles (10–14 Hz) and the disappearance of phasic muscle activity. The occurrence of muscle atonia with a regular and pronounced theta rhythm (4–9 Hz) characterized REM sleep. Hypnograms were drawn using a homemade script in Spike-2 software (CED). The mean±SEM of the vigilance states quantities were then calculated for each condition. In addition, normalized EEG spectral power was calculated with a Spike-2 script computing a fast Fourier transform on 5 s EEG epochs (0.1 Hz resolution) during REM sleep recovery in the RSR-Sham and RSR-Lesion animals. The mean±SEM of the power of each band of the EEG was then calculated (Frequency range (Hz): Delta [0.5-4.5]; Theta [5 -9]; Sigma [10-14]; Beta1 [15-22.5]; Beta2 [22.5-30]; Gamma [30-48]).

Analysis of immunostaining

The atlas of Swanson was used as a reference for all structures (81). Drawings of double- or single-labeled sections were made with an Axioskop microscope (Zeiss, Germany) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator; ExploraNova, La Rochelle, France). The staining intensity level of *Bdnf* RNA expression and the distribution of the FOS (FOS+) and ARC (ARC+) immunoreactive cells was evaluated in 4 animals per condition on hemi-sections exactly taken at the same level (+0.45mm; -3.70mm; -7.10mm from Bregma)(see an example of selected sections in fig. S2). The COX2 staining intensity level was measured in the different regions of the hippocampal formation at -3.70mm from Bregma in the 3 conditions (RSC, RSD and RSR). For *Bdnf* and COX2, photomicrographs of each cortical region studied were analyzed using ImageJ software. The optical density was first normalized using the white matter reading of each analyzed section and then measured for each structure inside 20 squares of 60 pixels randomly distributed. Using Mercator (ExploraNova), The FOS/CTb+, singly CTb+ or FOS/FG+ and singly FG+ labeled cells were plotted in 4 RSR animals for each structure studied on sections quantified every 600 μ m (25 sections). The number of FOS+ neurons in RSR and W animals was also quantified on sections at the level of the supramammillary nucleus (-4.5mm from Bregma), the basal forebrain (+0.45mm from Bregma) and the thalamic nuclei (-3.5mm from Bregma). The mean diameter of the FOS+ and ARC+ labeled neurons was calculated for each structure and each animal. The Abercrombie correction factor (82) was then applied on the number of FOS+ and ARC+ plotted neurons to correct for duplicate counting.

Statistical analysis

Analysis of variance (Kruskal-Wallis test following by Mann-Whitney test) was performed on the different vigilance states, power spectrum analysis, gene expression level and on the number of labeled neurons for each structure across experimental conditions (RSC, RSD, RSR, W, RSR-Sham and RSR-Lesion). Spearman test was used to identify significant correlations between vigilance state amounts and gene expression level. All statistics were performed using Statview.

Supplementary Materials

Fig. S1 Histograms showing gene expression levels in the hippocampus and cortex of RSC, RSD and RSR rats and correlations between the amount of REM sleep and the expression level of several genes. Fig. S2 Series of

representative schematic transverse sections depicting the location of FOS labeled cells (black dots) in representative RSC, RSD, RSR and waking rats.

Fig. S3 EEG analysis after lesion of the supramammillary nucleus.

Table S1 Complete listing of the genes and ESTs in the hippocampus and in the neocortex with a modification of expression level induced by our protocol.

Table S2 Mean \pm SEM number of cells or value of optical density quantified in cortical regions on sections labeled for *Bdnf* (A), ARC (B) and COX-2 (C) in RSC, RSD and RSR rats.

Table S3 Mean \pm SEM number of neurons immunoreactive for FOS in RSC, RSD, RSR and Waking rats

Table S4 Mean number (\pm SEM) of CTb/FOS+ and singly CTb+ neurons in RSR rats (n=4) with a CTb injection in the dentate gyrus and CTb injection in the retrosplenial cortex.

Table S5 : Mean number (\pm SEM) of fluorogold/FOS+ double-labeled neurons and singly fluorogold+ neurons in RSR rats (n=4) with a fluorogold injection in the anterior cingulate cortex.

Table S6 : Mean (\pm SEM) number of FOS immunoreactive cells in RSR and Waking animals (n=4 per condition) in the basal forebrain, the supramammillary nucleus and the thalamus.

Table S7: Mean number (\pm SEM) of FOS immunoreactive neurons in cortical regions in the RSR-Sham and RSR-Lesion animals.

References

1. W. C. Dement, N. Kleitman, Cyclic variations of EEG during sleep and their relation to eye movement, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **9**, 673-690 (1957).
2. K. J. Maloney, E. G. Cape, J. Gotman, B. E. Jones, High-frequency gamma electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience* **76**, 541-555 (1997).
3. P. Maquet, J. Peters, J. Aerts, G. Delfiore, C. Degueldre, A. Luxen, G. Franck, Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* **383**, 163-166 (1996).
4. V. V. Vyazovskiy, U. Olcese, Y. M. Lazimy, U. Faraguna, S. K. Esser, J. C. Williams, C. Cirelli, G. Tononi, Cortical firing and sleep homeostasis. *Neuron* **63**, 865-878 (2009).
5. M. Steriade, I. Timofeev, F. Grenier, Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* **85**, 1969-1985 (2001).
6. E. A. Nofzinger, M. A. Mintun, M. Wiseman, D. J. Kupfer, R. Y. Moore, Forebrain activation in REM sleep: an FDG PET study. *Brain Res* **770**, 192-201 (1997).
7. A. R. Braun, T. J. Balkin, N. J. Wesenten, R. E. Carson, M. Varga, P. Baldwin, S. Selbie, G. Belenky, P. Herscovitch, Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H2(15)O PET study. *Brain* **120** (Pt 7), 1173-1197 (1997).
8. R. Lydic, H. A. Baghdoyan, L. Hibbard, E. V. Bonyak, M. R. DeJoseph, R. A. Hawkins, Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat: a preliminary study. *J Comp Neurol* **304**, 517-529 (1991).

9. J. P. Sastre, C. Buda, J. S. Lin, M. Jouvet, Differential c-fos expression in the rhinencephalon and striatum after enhanced sleep-wake states in the cat. *Eur J Neurosci* **12**, 1397-1410 (2000).
10. J. Luo, T. X. Phan, Y. Yang, M. G. Garelick, D. R. Storm, Increases in cAMP, MAPK activity, and CREB phosphorylation during REM sleep: implications for REM sleep and memory consolidation. *J Neurosci* **33**, 6460-6468 (2013).
11. S. Ribeiro, V. Goyal, C. V. Mello, C. Pavlides, Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem* **6**, 500-508 (1999).
12. S. Ribeiro, C. V. Mello, T. Velho, T. J. Gardner, E. D. Jarvis, C. Pavlides, Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* **22**, 10914-10923 (2002).
13. P. Fort, C. L. Bassetti, P. H. Luppi, Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci* **29**, 1741-1753 (2009).
14. C. B. Saper, P. M. Fuller, N. P. Pedersen, J. Lu, T. E. Scammell, Sleep state switching. *Neuron* **68**, 1023-1042 (2010).
15. M. Ashburner, S. Lewis, On ontologies for biologists: the Gene Ontology--untangling the web. *Novartis Found Symp* **247**, 66-80; discussion 80-63, 84-90, 244-252 (2002).
16. C. C. Tsui, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, C. Barnes, P. F. Worley, Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *Journal of Neuroscience* **16**, 2463-2478 (1996).
17. K. Yamagata, K. I. Andreasson, H. Sugiura, E. Maru, M. Dominique, Y. Irie, N. Miki, Y. Hayashi, M. Yoshioka, K. Kaneko, H. Kato, P. F. Worley, Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 19473-19479 (1999).
18. J. F. Guzowski, Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* **12**, 86-104 (2002).
19. C. Cirelli, M. Pompeiano, G. Tononi, Neuronal gene expression in the waking state: a role for the locus coeruleus. *Science* **274**, 1211-1215 (1996).
20. R. P. Vertes, PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* **326**, 595-622 (1992).
21. L. Verret, R. Goutagny, P. Fort, L. Cagnon, D. Salvert, L. Leger, R. Boissard, P. Salin, C. Peyron, P. H. Luppi, A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* **4**, 19 (2003).
22. L. Verret, L. Leger, P. Fort, P. H. Luppi, Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* **21**, 2488-2504 (2005).
23. L. Verret, P. Fort, D. Gervasoni, L. Leger, P. H. Luppi, Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol* **495**, 573-586 (2006).

24. J. E. Sherin, P. J. Shiromani, R. W. McCarley, C. B. Saper, Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* **271**, 216-219 (1996).
25. K. J. Maloney, L. Mainville, B. E. Jones, Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* **19**, 3057-3072 (1999).
26. K. J. Maloney, L. Mainville, B. E. Jones, c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* **15**, 774-778 (2002).
27. K. J. Maloney, L. Mainville, B. E. Jones, c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* **20**, 4669-4679 (2000).
28. R. Boissard, D. Gervasoni, M. H. Schmidt, B. Barbagli, P. Fort, P. H. Luppi, The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* **16**, 1959-1973 (2002).
29. J. Lu, D. Sherman, M. Devor, C. B. Saper, A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* **441**, 589-594 (2006).
30. E. Sapin, D. Lapray, A. Berod, R. Goutagny, L. Leger, P. Ravassard, O. Clement, L. Hanriot, P. Fort, P. H. Luppi, Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS ONE* **4**, e4272 (2009).
31. E. Sapin, A. Berod, L. Leger, P. A. Herman, P. H. Luppi, C. Peyron, A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One* **5**, e11766 (2010).
32. O. Clement, E. Sapin, A. Berod, P. Fort, P. H. Luppi, Evidence that Neurons of the Sublaterodorsal Tegmental Nucleus Triggering Paradoxical (REM) Sleep Are Glutamatergic. *Sleep* **34**, 419-423 (2011).
33. K. C. Hsieh, I. Gvilia, S. Kumar, A. Uschakov, D. McGinty, M. N. Alam, R. Szymusiak, c-Fos expression in neurons projecting from the preoptic and lateral hypothalamic areas to the ventrolateral periaqueductal gray in relation to sleep states. *Neuroscience* **188**, 55-67 (2011).
34. F. R. Morales, S. Sampogna, C. Rampon, P. H. Luppi, M. H. Chase, Brainstem glycinergic neurons and their activation during active (rapid eye movement) sleep in the cat. *Neuroscience* **142**, 37-47 (2006).
35. F. R. Morales, S. Sampogna, J. Yamuy, M. H. Chase, c-fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J Neurosci* **19**, 9508-9518 (1999).
36. M. Modirrousta, L. Mainville, B. E. Jones, Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci* **21**, 2807-2816 (2005).
37. J. Yamuy, J. R. Mancillas, F. R. Morales, M. H. Chase, C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. *J Neurosci* **13**, 2703-2718 (1993).

38. Y. Koyama, K. Takahashi, T. Kodama, Y. Kayama, State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience* **119**, 1209-1219 (2003).
39. R. Goutagny, P. H. Luppi, D. Salvert, D. Lapray, D. Gervasoni, P. Fort, Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. *Neuroscience* **152**, 849-857 (2008).
40. R. Goutagny, P. H. Luppi, D. Salvert, D. Gervasoni, P. Fort, GABAergic control of hypothalamic melanin-concentrating hormone-containing neurons across the sleep-waking cycle. *Neuroreport* **16**, 1069-1073 (2005).
41. O. K. Hassani, M. G. Lee, B. E. Jones, Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2418-2422 (2009).
42. O. K. Hassani, P. Henny, M. G. Lee, B. E. Jones, GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci*, (2010).
43. P. H. Luppi, R. Boissard, D. Gervasoni, L. Verret, R. Goutagny, C. Peyron, D. Salvert, L. Leger, B. Barbagli, P. Fort, in *Sleep: circuits and function*, P. H. Luppi, Ed. (CRC Press, 2004), pp. 272.
44. C. Sirieix, D. Gervasoni, P. H. Luppi, L. Leger, Role of the lateral paragigantocellular nucleus in the network of paradoxical (REM) sleep: an electrophysiological and anatomical study in the rat. *PLoS ONE* **7**, e28724 (2012).
45. P. H. Luppi, O. Clement, E. Sapin, C. Peyron, D. Gervasoni, L. Leger, P. Fort, Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflugers Arch* **463**, 43-52 (2012).
46. L. Yassin, B. L. Benedetti, J. S. Jouhanneau, J. A. Wen, J. F. Poulet, A. L. Barth, An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. *Neuron* **68**, 1043-1050 (2010).
47. M. Dragunow, R. Faull, The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* **29**, 261-265 (1989).
48. K. R. Melia, A. E. Ryabinin, R. Schroeder, F. E. Bloom, M. C. Wilson, Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J Neurosci* **14**, 5929-5938 (1994).
49. K. Wibrand, E. Messaoudi, B. Havik, V. Steenslid, R. Lovlie, V. M. Steen, C. R. Bramham, Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* **23**, 1501-1511 (2006).
50. T. Ingi, A. M. Krumins, P. Chidiac, G. M. Brothers, S. Chung, B. E. Snow, C. A. Barnes, A. A. Lanahan, D. P. Siderovski, E. M. Ross, A. G. Gilman, P. F. Worley, Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* **18**, 7178-7188 (1998).
51. J. D. English, J. D. Sweatt, A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *The Journal of biological chemistry* **272**, 19103-19106 (1997).

52. P. Ramm, B. J. Frost, Cerebral and local cerebral metabolism in the cat during slow wave and REM sleep. *Brain Res* **365**, 112-124 (1986).
53. S. M. Montgomery, A. Sirota, G. Buzsaki, Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci* **28**, 6731-6741 (2008).
54. A. D. Grosmark, K. Mizuseki, E. Pastalkova, K. Diba, G. Buzsaki, REM sleep reorganizes hippocampal excitability. *Neuron* **75**, 1001-1007 (2012).
55. W. D. Snider, Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**, 627-638 (1994).
56. G. M. Sia, J. C. Beique, G. Rumbaugh, R. Cho, P. F. Worley, R. L. Huganir, Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment. *Neuron* **55**, 87-102 (2007).
57. C. Cirelli, C. M. Gutierrez, G. Tononi, Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron* **41**, 35-43 (2004).
58. S. Maret, S. Dorsaz, L. Gurcel, S. Pradervand, B. Petit, C. Pfister, O. Hagenbuchle, B. F. O'Hara, P. Franken, M. Tafti, Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20090-20095 (2007).
59. G. Tononi, C. Cirelli, Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res Bull* **62**, 143-150 (2003).
60. Y. Nir, V. V. Vyazovskiy, C. Cirelli, M. I. Banks, G. Tononi, Auditory Responses and Stimulus-Specific Adaptation in Rat Auditory Cortex are Preserved Across NREM and REM Sleep. *Cereb Cortex*, (2013).
61. R. Goutagny, P. Fort, D. Lapray, P. H. Luppi, Role of dorsal paragigantocellular nucleus in paradoxical sleep regulation: a study combining electrophysiology and pharmacology across vigilance states in the rat. *Soc Neurosci (Abstr.)*, (2005).
62. M. Pompeiano, C. Cirelli, G. Tononi, Immediate-early genes in spontaneous wakefulness and sleep: expression of c-fos and NGFI-A mRNA and protein. *J Sleep Res* **3**, 80-96 (1994).
63. C. Cirelli, G. Tononi, On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. *Sleep* **23**, 453-469 (2000).
64. J. Kiss, A. Csaki, H. Bokor, M. Shanabrough, C. Leranth, The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [³H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* **97**, 657-669 (2000).
65. R. Soussi, N. Zhang, S. Tahtakran, C. R. Houser, M. Esclapez, Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. *Eur J Neurosci* **32**, 771-785 (2010).
66. I. J. Kirk, Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 291-302 (1998).

67. M. Ruan, C. K. Young, N. McNaughton, Minimal driving of hippocampal theta by the supramammillary nucleus during water maze learning. *Hippocampus*, (2010).
68. J. S. Thinschmidt, G. G. Kinney, B. Kocsis, The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience* **67**, 301-312 (1995).
69. R. P. Vertes, B. Kocsis, Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* **81**, 893-926 (1997).
70. F. C. Crick, C. Koch, What is the function of the claustrum? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **360**, 1271-1279 (2005).
71. R. J. Maddock, The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci* **22**, 310-316 (1999).
72. J. K. Leutgeb, S. Leutgeb, M. B. Moser, E. I. Moser, Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* **315**, 961-966 (2007).
73. L. Aranda, A. Begega, J. Sanchez-Lopez, J. A. Aguirre, J. L. Arias, L. J. Santin, Temporary inactivation of the supramammillary area impairs spatial working memory and spatial reference memory retrieval. *Physiol Behav* **94**, 322-330 (2008).
74. S. Shahidi, F. Motamedi, S. A. Bakeshloo, B. K. Taleghani, The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* **152**, 81-87 (2004).
75. M. P. Walker, The role of sleep in cognition and emotion. *Ann N Y Acad Sci* **1156**, 168-197 (2009).
76. L. Leger, R. Goutagny, E. Sapin, D. Salvert, P. Fort, P. H. Luppi, Noradrenergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep deprivation in the rat. *J Chem Neuroanat*, (2008).
77. J. Serrats, P. E. Sawchenko, CNS activational responses to staphylococcal enterotoxin B: T-lymphocyte-dependent immune challenge effects on stress-related circuitry. *J Comp Neurol* **495**, 236-254 (2006).
78. M. W. Waung, B. E. Pfeiffer, E. D. Nosyreva, J. A. Ronesi, K. M. Huber, Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* **59**, 84-97 (2008).
79. W. E. Kaufmann, P. F. Worley, J. Pegg, M. Bremer, P. Isakson, COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2317-2321 (1996).
80. P. C. Maisonpierre, M. M. Le Beau, R. Espinosa, 3rd, N. Y. Ip, L. Belluscio, S. M. de la Monte, S. Squinto, M. E. Furth, G. D. Yancopoulos, Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* **10**, 558-568 (1991).

81. L. W. Swanson, *Brain maps : structure of the rat brain : a laboratory guide with printed and electronic templates for data, models, and schematics*. (Elsevier, New York, ed. 2nd rev., 1998), pp. vii, 267.
82. M. Abercrombie, Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* **94**, 239-247 (1946).

Acknowledgments

Funding: This work was supported by INSERM (U1028), CNRS (UMR5292) and University Lyon1. It was also founded by the Program "CNRS puces à ADN" and the Program "Ministère de la Recherche et Réseau National des Génopoles, aide à l'achat de puces à ADN Affymetrix". L.R received a financial support from the French Ministry of Research and the "Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil" (SFRMS).

Author contributions: M.A., P.F. and P.H.L. wrote and obtained the grants for the microarray study. M.A., K.O. and L.R. implanted the group of rats for the microarray study. C.P., L.L., L.R., C.S. and N.G. dissected the brains for the microarray study. K.O. scored the vigilance states of the rats for the microarray study. N.G., C.S., M.A. and N.C. carried out quantitative PCR. L.R. and P.H.L. analyzed the data of the microarray. N.C., D.S., P.F., R.T., L.L., F.B. and L.R. performed the immunohistochemical study. L.R. and F.B. analyzed the immunohistochemical data. O.C. performed the *Bdnf* experiment. K.O. and L.R. performed the lesions and L.R. and F.B. collected and analyzed data from the rats. L.R. performed and analyzed the experiments with tracer injections. P.A.L. wrote the program of the spectral analysis and L.R. analyzed the sleep data. P.H.L. and L.R. wrote the article, L.R. made the figures. G.M., L.L., P.R., P.F. and P.S. corrected the manuscript.

Figures and Tables

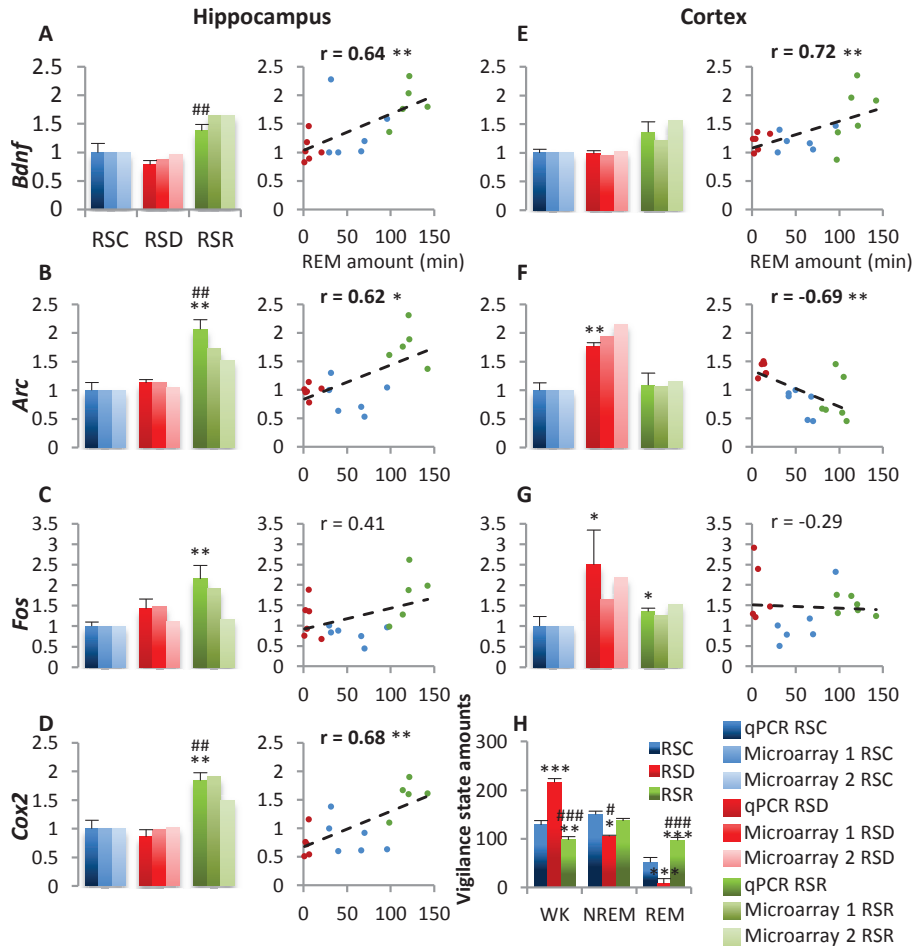


Figure 1. Expression level of plasticity-related genes and REM sleep amounts as quantified in the microarrays.

Histograms showing Bdnf, Arc, Fos and Cox2 expression levels in the hippocampus (A-D) and the cortex (E-G) in RSC (blue), RSD (red) and RSR (green) rats. For all conditions, the bar on the left shows the mean \pm SEM expression level of each gene measured by qPCR relative to the RSC condition (6 rats per group). The other two bars show the expression level relative to the RSC condition measured by the two microarrays in two independent groups (6 rats per condition). (Kruskal Wallis followed by Mann Whitney. RSD vs RSC or RSR vs RSC: $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.05$. RSD vs RSR $^{##}p<0.01$, $^{#}p<0.05$). The graphs show the correlations between the REM sleep amounts (in min) during the last 6h of the protocol and the expression level of Bdnf, Arc, Fos and Cox2 measured by qPCR (6 rats per condition, Spearman test, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$). Histogram showing the vigilance states amount in minutes during the last 6 hours of the protocol (H) in RSC, RSD and RSR animal (12 rats per condition). Significance : Kruskal Wallis followed by Mann Whitney, RSD vs RSR vs RSC: $^{***}p<0.0001$, $^{**}p<0.001$, $^{*}p<0.05$. RSR vs RSD $^{###}p<0.0001$, $^{##}p<0.001$, $^{#}p<0.05$. Bdnf (A), Arc (B), Fos (C) and Cox2 (D) mRNA expression levels are significantly increased in the hippocampus in RSR rats compared to RSC and RSD rats and Bdnf, Arc and Cox2 expression is positively correlated with REM sleep quantities. In the cortex, Bdnf (E) mRNA expression is increased in RSR rats compared to the other two conditions and is positively correlated with REM sleep amounts while Arc (F) and Fos (G) mRNA level is increased after REM sleep deprivation and Arc expression level is negatively correlated with REM sleep amounts.

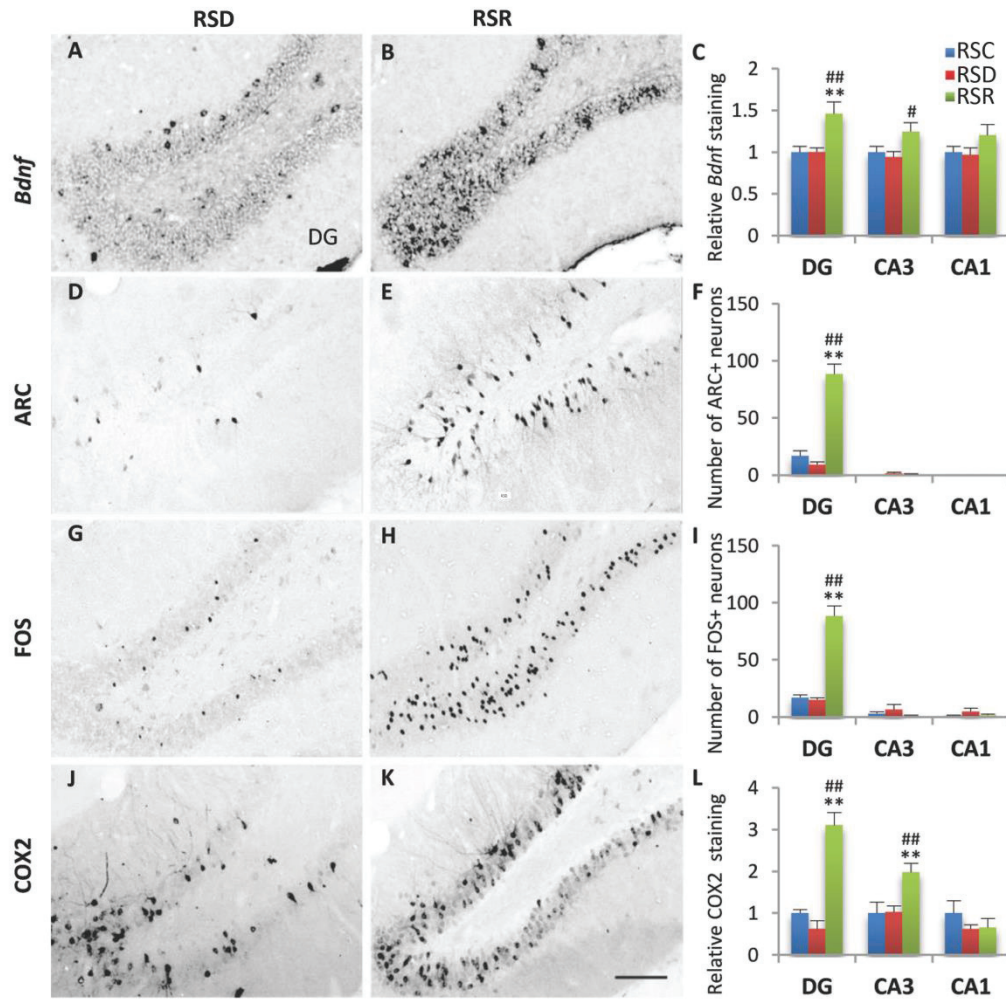


Figure 2. The expression of plasticity-related markers is increased in the granule layer of the dentate gyrus during REM sleep hypersomnia.

Photomicrographs and histograms showing the in situ hybridization of *Bdnf* (A-C) and the immunohistochemistry of ARC (D-F), FOS (G-I) and COX2 (J-L) in the dentate gyrus (DG), CA3 and CA1 in RSD (A, D, G and J) and RSR (B, E, H and K) rats. The photomicrographs show that the number of *Bdnf*, ARC, FOS, and COX2 stained neurons is increased in the DG in RSR rats compared to RSD rats. The histograms also show an increase of the *Bdnf* and COX2 staining in CA3. In contrast, there is no change in CA1 among conditions for any marker. (Bar = 50 μ m). Significance: Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ RSD vs RSC or RSC vs RSR. ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ RSD vs RSR.

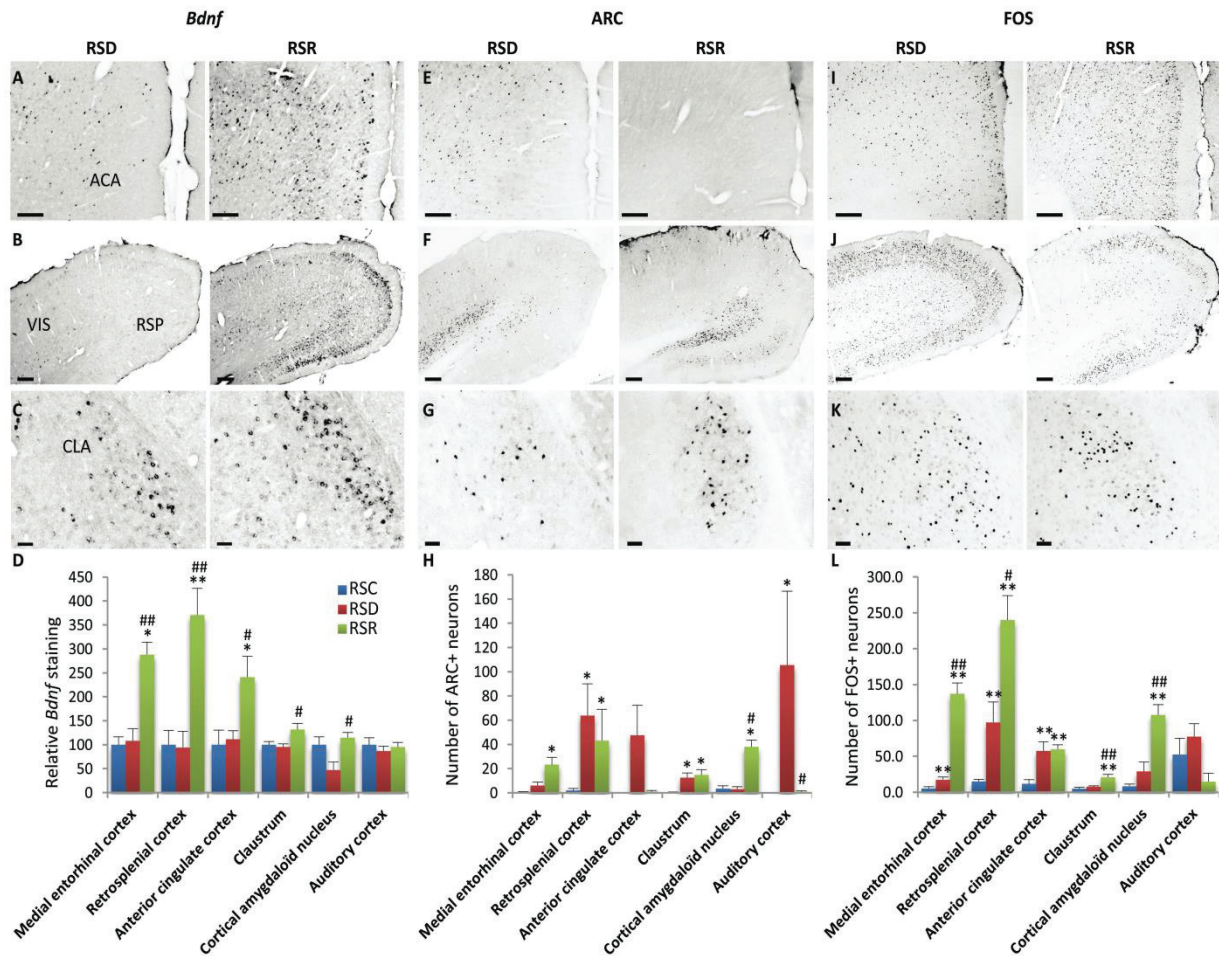


Figure 3. The expression of plasticity-related markers is increased in a subset of cortical neurons during REM sleep hypersomnia.

The photomicrographs show Bdnf (A-C) in situ hybridization staining and ARC (E-G) and FOS (I-K) immunostaining in the anterior cingulate (ACA) (A, E and I) and retrosplenial cortices (RSP) (B, F and J) and in the claustrum (CLA) (C, G and K) of RSD and RSR representative rats. In D, the histograms show the mean \pm SEM intensity of Bdnf labeling in 6 cortical areas in the RSD and RSR groups relative to the RSC group. The other two histograms show the mean \pm SEM number of ARC+ (H) and FOS+ (L) cells in the same cortical areas and same experimental conditions. Bdnf labeling (A-D) is significantly increased in RSR rats compared to the other two groups of rats in the anterior cingulate (ACA) (A), medial entorhinal, retrosplenial (RSP) (B) cortices, the claustrum (CLA) (C) and the cortical amygdaloid nucleus. The retrosplenial cortex (F) and the claustrum (G) contained a significant higher number of ARC+ cells in RSR but also in RSD rats compared to the RSC group. (H) The cortical amygdaloid nucleus and to a minor extent the medial entorhinal cortex contained a significantly increased number of ARC+ neurons only during REM sleep hypersomnia compare to control group. The auditory cortex contained a significant higher number of ARC+ cells specifically in RSD rats. The number of FOS+ cells is increased in the medial entorhinal and retrosplenial cortices (J), the claustrum (K) and the cortical amygdaloid nucleus in the RSR group compared to the other two groups. Bars in A, B, E, F, I and J: 200 μ m. Bars in C, G and K: 25 μ m. Significance: Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ RSD vs RSC or RSC vs RSR. # $p < 0,01$, # $p < 0,05$ RSD vs RSR (see also Figure S2 and Table S3 for the complete quantification).

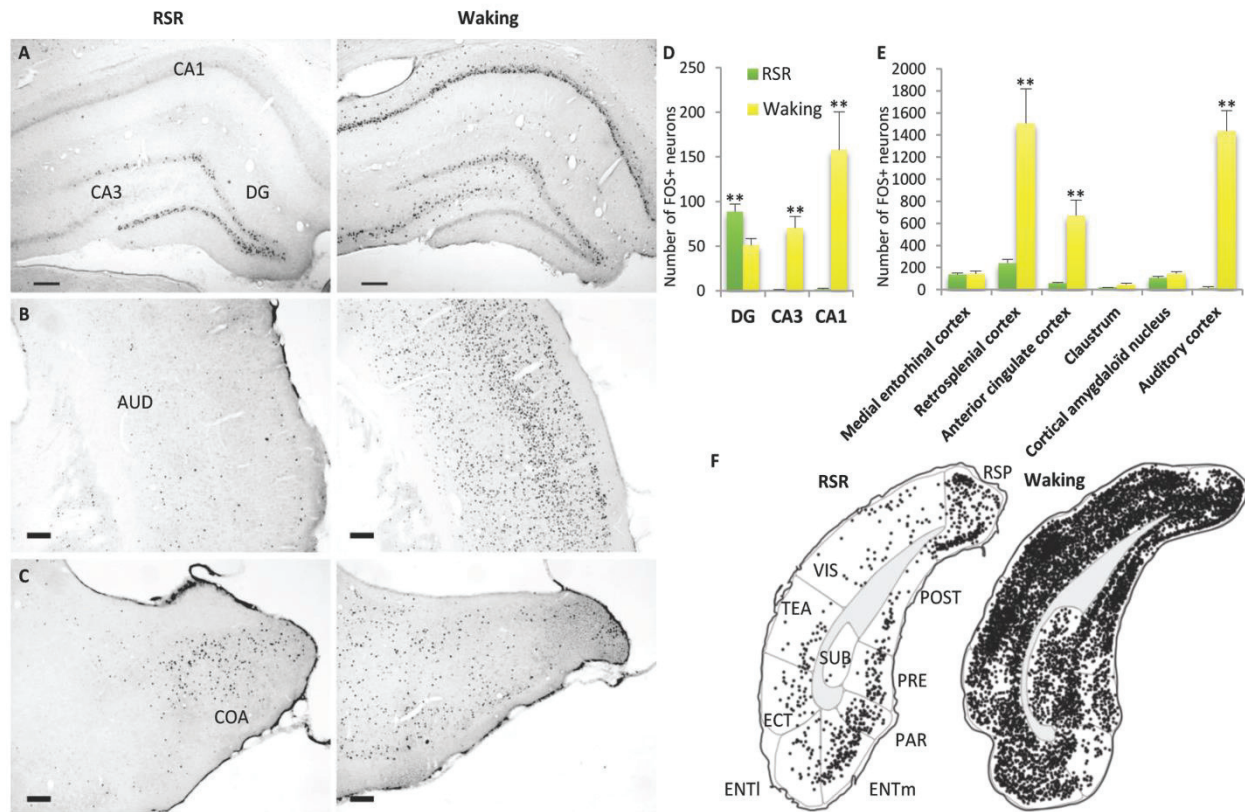


Figure 4. A restricted number of cortical structures are active during REM sleep hypersomnia compared to W.

The photomicrographs show FOS immunostaining in the hippocampus (A), the auditory (B) and the cortical amygdaloid nucleus (C) of RSR and Waking rats. Bars in A-C: 200 μ m. The histograms (D, E) show the mean \pm SEM number of FOS+ cells in the hippocampal formation and in 6 cortical areas (n=4 rats per condition). The drawings (F) illustrate the distribution of FOS+ cells on coronal sections located at -7.10 mm relative to Bregma in RSR and Waking rats. The dentate gyrus (DG) (A), the medial entorhinal cortex (ENTm) (F), the claustrum (CLA) and the cortical amygdaloid nucleus (COA) (C) are the only structures in which the number of FOS+ cells is similar in RSR and Waking rats. The dorsal CA1, known to contain place cells, displays a large number of Fos-labeled cells only after Waking (A, D). The auditory (AUD) (B, E) and the visual (VIS) (F) cortices contain a very large number of FOS-labeled neurons in Waking and in contrast only a small number of FOS-labeled cells during REM sleep recovery. The medial entorhinal and the retrosplenial (RSP)(E, F) cortices and the anterior cingulate cortices (ACA) are activated during REM sleep hypersomnia but to a lower extent than during waking. Bars in A, B, C = 200 μ m. Significance: Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. ** p < 0,01, * p < 0,05 RSR vs W (see also Figure S2 and Table S4). ECT, Ectorhinal area ; ENTl, Entorhinal area, lateral part ; PAR, Parasubiculum ; POST, Postsubiculum ; PRE, Presubiculum ; SUB, Subiculum ; TEA, Temporal association areas.

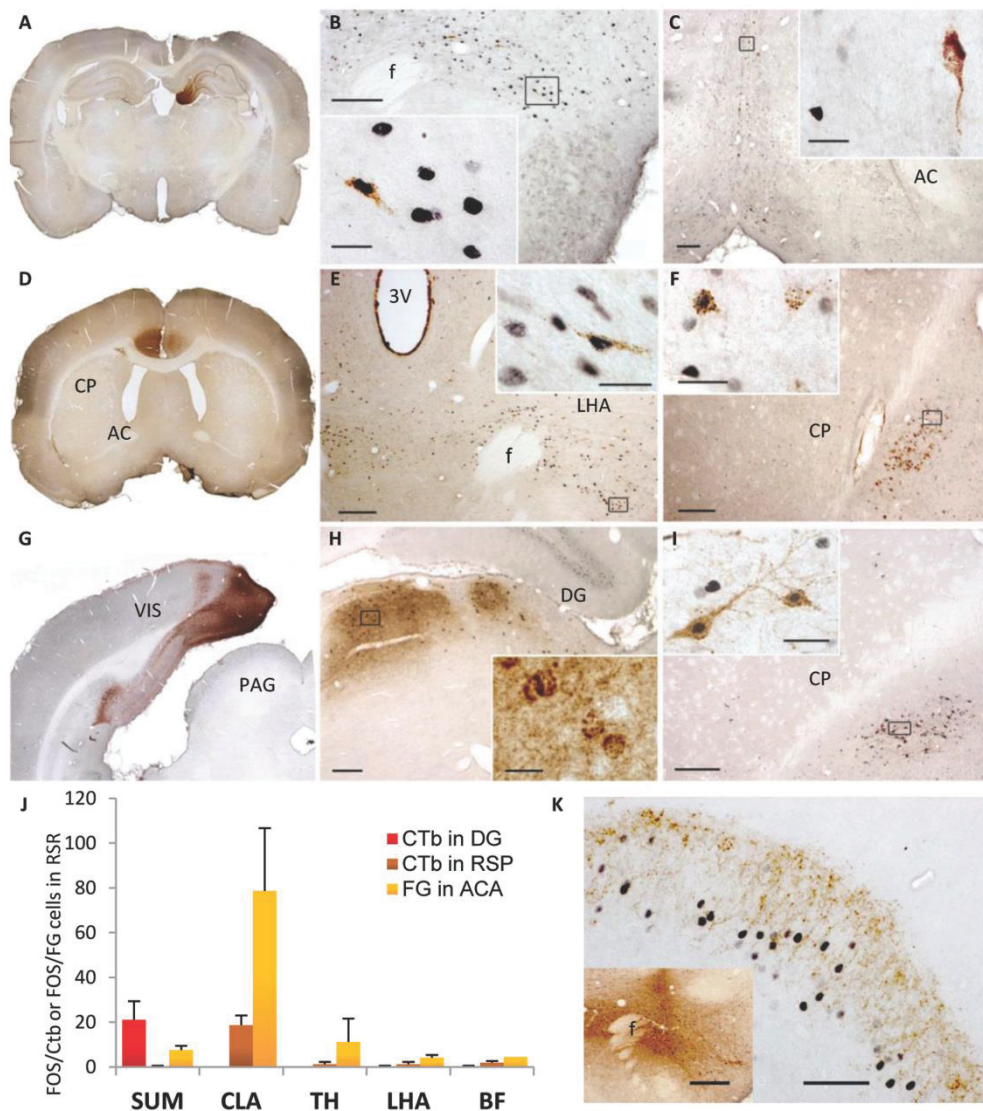


Figure 5. The dentate gyrus and the anterior cingulate and retrosplenial cortices receive projections from the lateral part of the supramammillary nucleus and the claustrum active during REM sleep hypersomnia.

(A-I) Photomicrographs showing in RSR rats double-labeled cells with a black FOS labeled nucleus and a brown labeled cytoplasm (retrogradely labeled) (Bar = 200 μ m, inset: Bar = 25 μ m). After CTb injection in the dentate gyrus (DG) (A), the lateral part of the supramammillary nucleus (SUM, B) is the only region containing FOS/CTb+ cells; the large number of CTb+ neurons in the medial septum (C) do not express the FOS protein. After FG injection in the anterior cingulate cortex (ACA) (D), a large number of double-labeled cells is seen in the claustrum (CLA) (F, J), a small number is observed in the SUM (E, J) and only a few in the thalamic nuclei (TH) (H, J). Following CTb injection in the retrosplenial cortex (RSP) (G), FOS/CTb+ cells are observed only in the CLA (I, J). The large number of CTb+ cells located in the thalamic nuclei (H), do not express the FOS protein (J). The histograms in J show the mean \pm SEM number of FOS/CTb+ or FOS/FG+ cells contained in the major areas projecting to the DG, ACA and RSP (4 rats per structure, 3 sections quantified for the SUM, details given in Table S4 and S5) (K) A large number of anterogradely labeled fibers (in brown) are seen in close vicinity of FOS+ neurons (in black) in the dentate gyrus of a RSR rat after a CTb injection in the SUM (inset)(bar = 50 μ m, inset 500 μ m) AC, anterior commissure; CP, caudate putamen ; f, fornix; PAG, periaqueductal gray; pm, principal mammillary tract ; VIS, visual cortex.

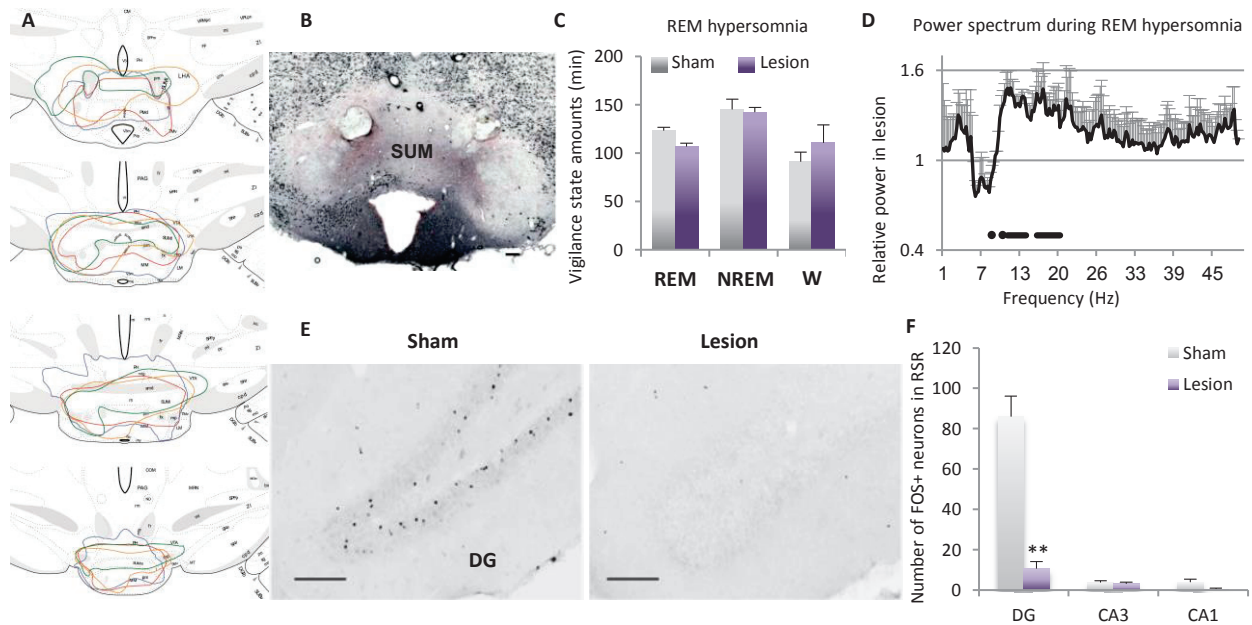


Figure 6. Lesion of the supramammillary nucleus alters dentate gyrus activation during REM sleep hypersomnia.

(A) Series of schematic transverse sections modified from the Swanson atlas depicting the extent of each lesion of the SUM (one color per animal) (B) Illustration of a representative neurotoxic lesion of the SUML in a section immunostained with NeuN. (C) Histogram illustrating the quantities of each vigilance state in lesioned and sham rats ($n = 4$ per group) during the 6 h preceding euthanasia (Kruskal Wallis followed by Mann-Whitney). (D) Graph showing the mean spectral power of the EEG during REM sleep hypersomnia in the lesioned rats (\pm SEM) in relative value compared to the sham rats. The horizontal black points and lines below the graph show the frequency bins significantly different between the two conditions according to the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($p < 0.05$). (E-F) Photomicrographs and histogram showing that the lesion of the SUML induces a strong decrease in the number of FOS+ neurons in the dentate gyrus compared to sham (bars = $50\mu\text{m}$). Significance: Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ RSR-Sham vs RSR-Lesion (see also Figure S3 and Table S8).

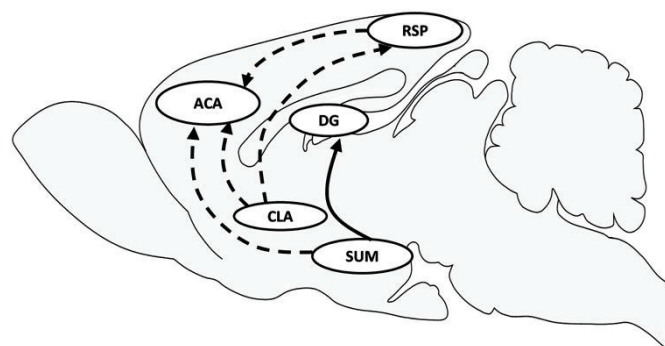


Figure 7. Pathways and structures activated during REM sleep according to FOS imaging and retrograde tracing studies.

The solid line shows the pathway demonstrated by the retrograde tracing studies and confirmed by the lesion of the SUML. The dash lines show the other pathways revealed by retrograde tracing. Abbreviations: ACA, anterior cingulate cortex; CLA, claustrum; DG, dentate gyrus; RSP, retrosplenial cortex.

ETUDE 2. Nature neurochimique des neurones SP-on du Sum

1. Contexte

Le travail de L. Renouard a démontré que le Sum est responsable de l'activation du GD au cours du SP. Nous avons ensuite analysé la nature neurochimique de cette voie Sum-GD pendant l'hypersomnie de SP. Les données de littérature montrent un double phénotype des neurones du Sum, à la fois glutamatergiques et GABAergiques (Soussi et al, 2010). Dans un premier temps, nous avons déterminé si les neurones du SumL activés au cours de l'hypersomnie de SP présentent également cette double nature GABA/glutamate.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'effet de la lésion du Sum sur l'activation neuronale dans le dGD et le vGD. Nous avons séparé le GD en parties dorsale et ventrale sur la base des nombreuses différences anatomiques et fonctionnelles existant entre ces deux zones (Ohara et al., 2013). Nous avons également analysé l'effet de la lésion du Sum sur la densité de fibres glutamatergiques (immunoréactives au vGLUT2) le long de l'axe dorso-ventral du GD. Les résultats montrent que la lésion du Sum induit une réduction drastique de neurones FOS⁺ et des fibres glutamatergiques dans le dGD mais pas dans le vGD pendant l'hypersomnie de SP. Ces données suggèrent que les neurones glutamatergiques et GABAergiques du SumL sont responsables de l'activation du dGD au cours du SP. Pour identifier la(les) structure(s) responsable(s) de l'activation du vGD au cours du SP, nous avons ensuite éjecté un traceur rétrograde dans le vGD et nous avons observé après hypersomnie de SP un grand nombre de neurones FOS⁺ et rétrogradement marqués dans le cortex enthorinal médian (mENT). Cette structure semble donc être responsable de l'activation du vGD au cours de l'hypersomnie de SP.

Ce travail a été récemment publié dans le journal «Brain structure & fonction».

2. Article 2

Differential origin of the activation of dorsal and ventral dentate gyrus granule cells during paradoxical (REM) sleep in the rat

Francesca Billwiller ¹, Leslie Renouard ¹, Olivier Clement¹, Patrice Fort¹ and Pierre-Hervé Luppi^{1*}

¹*UMR 5292 CNRS/U1028 INSERM, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL), SLEEP Team, Université Claude Bernard Lyon I, Faculté de Médecine RTH Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, France.*

Number of text pages: 19

Number of Figures: 5

Number of Tables: 1

* Corresponding author : Dr Pierre-Hervé Luppi

Team SLEEP, UMR 5292 CNRS/U1028 INSERM,

7, Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON cedex 08, FRANCE

Tel number: (+33) 4 78 77 10 40

Fax number: (+33) 4 78 77 10 22

E-mail address: luppi@sommeil.univ-lyon1.fr

Acknowledgments: This work was supported by CNRS, Fondation pour la recherche médicale (FRM), Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil (SFRMS) and University Claude Bernard of Lyon

Abstract

We recently demonstrated that granule cells located in the dorsal dentate gyrus (dDG) are activated by neurons located in the lateral supramammillary nucleus (SumL) during paradoxical sleep (PS) hypersomnia. To determine whether these neurons are glutamatergic and/or GABAergic, we combined FOS immunostaining with *in situ* hybridization of vesicular glutamate transporter 2 (vGLUT2, a marker of glutamatergic neurons) or that of the vesicular GABA transporter (vGAT, a marker of GABAergic neurons) mRNA in rats displaying PS hypersomnia (PSR). We found that 84% and 76% of the FOS+ SumL neurons in PSR rats expressed vGLUT2 and vGAT mRNA, respectively. Then, we examined vGLUT2 and FOS immunostaining in the dorsal and ventral DG of PSR rats with a neurochemical lesion of the Sum. In PSR lesioned animals but not in sham animals, nearly all vGLUT2+ fibers and FOS+ neurons disappeared in the dDG but not in the ventral DG (vDG). To identify the pathway (s) responsible (s) for the activation of the vDG during PS hypersomnia, we combined Fluorogold (FG) injection in the vDG of PSR rats with FOS staining. We found a large number of neurons FOS-FG+ specifically in the medial entorhinal cortex (ENTm). Altogether, our results suggest that SumL neurons with a unique dual glutamatergic and GABAergic phenotype are responsible for the activation of the dDG during PS hypersomnia while vDG granule neurons are activated by ENTm cortical neurons. These results suggest differential mechanisms and functions for the activation of the dDG and the vDG granule cells during PS.

Introduction

Paradoxical (REM) sleep (PS) is characterized by muscle atonia, rapid eye movements (REM) and cortical and hippocampal activation (Jouvet et al. 1959). We recently showed that the dentate gyrus (DG) is strongly activated during PS. Indeed, a large number of neurons with an increased expression of FOS, BDNF, COX2 and ARC, known markers of activation and/or synaptic plasticity are selectively observed specifically in the DG in PS hypersomniac rats compared to control and PS deprived animals (Renouard et al. 2015). We further found out combining FOS labelling after PS hypersomnia with retrograde tracer injection in the dorsal part of the DG (dDG) that the lateral part of the supramammillary nucleus (SumL) is the only brain structure containing a large number of double-labelled neurons. Finally, we showed that a neurotoxic lesion of the Sum drastically decreases the number of FOS+ granule cells in the

dDG in PS hypersomniac animals (Renouard et al. 2015). These results suggest that SumL neurons are responsible for the activation of dDG granule cells during PS hypersomnia. Still, the neurotransmitter content of these neurons remained to be identified. A number of results suggested that they might display a unique dual glutamatergic and GABAergic phenotype. Indeed, after injection of the anterograde tracer BDA in the SumL, all terminals located in the dDG coexpressed vesicular GABA/glycine transporter (vGAT) and vesicular 2 glutamate transporter (vGLUT2), markers of GABAergic and glutamatergic neurons, respectively. The ventral dentate gyrus (vDG) contained less GABA/glutamate terminals coming from the SumL and received additional strictly glutamatergic projection from the medial part of the Sum (SumM)(Soussi et al. 2010). In view of all these results, our aim in the present study was to determine whether the SumL neurons expressing FOS during PS hypersomnia are indeed glutamatergic and GABAergic and whether they can be also responsible for the activation of the ventral DG (vDG) in addition to that of the dDG. To this aim, we used a combination of FOS immunostaining and *in situ* hybridization of vGLUT2 or vGAT mRNA in PS hypersomniac rats (PSR). In addition, we analyzed the distribution of the vGLUT2+ fibers and of the FOS+ neurons in the dDG and vDG of PSR animals after neurotoxic lesions of the Sum. Finally, we combined FOS labelling in PSR rats with retrograde tracer injection in the vDG.

Materials and Methods

All experiments were conducted in accordance to the French and European Community guidelines for the use of animals in research and approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon 1 (protocols BH 2006-09 and BH 2006-10).

Sprague-Dawley male rats were housed individually in recording barrels under a constant 12h light-dark cycle (light on from 07:00 AM to 07:00 PM). Room temperature was maintained at $21\pm1^{\circ}\text{C}$, and standard rodent food and water were available *ad libitum* throughout the experiment.

Animals and surgery

28 Male Sprague-Dawley rats (260-300 g, Charles River, n=12 for vGLUT2/FOS staining, n=4 for vGAT/FOS staining, n=8 for lesions experiments, n= 4 for Fluorogold injections) were implanted with electroencephalographic (EEG) and electromyographic (EMG) electrodes under ketamine (Virbac Santé Animale, 100 mg/kg, i.p) and xylazine (Bayer, 50

mg/kg, i.p) anaesthesia. Lidocaine (Xylovet, Ceva Santé Animale) injected subcutaneously was used for analgesia. Three stainless steel screws were fixed in the parietal, frontal and occipital parts of the skull while the reference electrode for unipolar EEG recording was fixed on the cerebellum bone. Two wire electrodes were inserted into the neck muscles for bipolar EMG recordings. All leads were connected to a miniature plug (Plastics One Inc.) that was cemented on the skull.

Lesion

Male Sprague-Dawley rats (260-300 g, Charles River) were anesthetized as described above and placed in a stereotaxic apparatus. The lesions were made bilaterally in four rats by passing a 10 μ A continuous current for 10 min through a micropipette containing ibotenic acid (25 mmol/L in distilled water adjusted at pH 8, Tocris) in each Sum (coordinates: AP: -4.5 mm to Bregma, ML: +0.6 mm lateral to midline, DP: 8.3 mm from the brain surface). Four sham rats were subjected to the same protocol with a micropipette containing 0.9% NaCl. All animals were then implanted for EEG and EMG recordings as described above.

Tracer injections

Male Sprague-Dawley rats (260-300 g, Charles River, n=4) were anesthetized as described above and placed in a stereotaxic apparatus. Glass micropipettes (4-5 μ m O.D.) were backfilled with Fluorogold (FG, Fluoprobe, diluted in distilled water at 8 mmol/L and pH 6) and lowered in the vDG (coordinates: AP -6 mm to Bregma, ML +4.1 mm lateral to midline, DP: 6.8 mm from the brain surface). FG was ejected during 15 min with a continuous current of +2 μ A. Animals were then implanted for EEG and EMG recordings as described above and submitted to PS deprivation and recovery procedure (see below) before being perfused.

Polygraphic recordings

Animals recovered from surgery during one week in a plexiglas jar before being habituated to the recording conditions for three days. Rats were connected to a cable attached to a slip-ring commutator to allow free movement of the animal within the jar. EEG and EMG recordings were collected on a computer via a CED interface using the Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

PS deprivation and recovery protocol

PS deprivation was performed using the flowerpot method (Verret et al. 2003). Rats were divided in 3 groups: control (PSC, n=4), deprived of PS for 3 days (PSD, n=4) and rats allowed recovering after such deprivation (PSR, n=20). PSC animals remained in their standard cage throughout the experiment. After 48 h of baseline recordings, PSD and PSR rats were placed at 10:00 AM in a standard container filled with water (2-3 cm depth) and containing three platforms (6.2 cm diameter, 7-12 cm height) spaced 7-8 cm apart, so that rats were able to easily move between them. For the FOS-vGLUT2, FOS-vGAT and FOS-FG experiments, animals were put on a single platform. During PSD, food and water were available *ad libitum* and the container was cleaned daily. The third day, PSR animals were removed from their cages at 10:00 AM and put on a dry bed of woodchips in recording jars to allow PS recovery. The animals used for the FOS-vGLUT2, FOS-vGAT and FOS-FG experiment were perfused three hours and the other PSR animals six hours after the onset of PS recovery.

Perfusion, fixation and sectioning

Animals were perfused with a Ringer's lactate solution containing 0.1% heparin followed by 500 ml of a fixative solution composed of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Brains were postfixed for 12 h at 4°C and then stored for 2 days at 4°C in a PB buffer containing 30% sucrose and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich). Brains were rapidly frozen in methylbutane (Sigma-Aldrich) cooled with dry ice and sliced on a cryostat (Microm). For immunohistochemistry experiments, brains were cut in 25 µm-thick coronal sections and stored in PB containing 0.9% NaCl, 0.3% Triton X-100 and 0.1% sodium azide (PBST-Az). For *in situ* hybridization experiments, brains were cut in 30 µm-thick coronal sections and stored at -20°C in an RNase-free cryoprotectant solution consisting of 20% Glycerol, 30% Ethylene Glycol and 0.05% RNase inhibitor in a 50 mM potassium-phosphate buffer (Sigma-Aldrich).

FOS immunohistochemistry combined with vGLUT2 or vGAT *in situ* hybridization

The recombinant plasmid (pCRII-TOPO, Invitrogen) containing the vGLUT2 cDNA was linearized using Not I and Hind III (New England Biolabs) and transcribed using SP6 and T7 RNA polymerases (for antisens and sens riboprobes, respectively). The vGAT riboprobes were prepared by PCR as previously described (Gandrillon et al. 1996). All riboprobes were transcribed using a non-radioactive RNA labelling kit (Roche Diagnostic) following

manufacturer's instructions. Digoxigenin-labelled riboprobes were then stored at -20°C in a hybridization buffer. As described before (Sapin et al. 2009), brain sections were successively incubated with a rabbit antiserum to FOS (1:3000 for vGLUT2, 1:4000 for vGAT, Merck), in 10 mM PB containing 0.9% NaCl and 0.3% Triton-100x (PBST) for 18 h at room temperature; a biotinylated goat anti-rabbit IgG solution (1:1000, Vector Laboratories) and an ABC-HRP solution (1:1000, Elite kit, Vector Laboratories), both for 90 min at room temperature. Then, sections were immersed for around 15 min in a 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.025% 3,3-diaminobenzidine-4 HCl (DAB, Sigma-Aldrich) and 0.003% H₂O₂. Sections were rinsed 3 times in PBST between each step. Then, they were incubated in PBST containing 10 mM dithio-threitol (DTT, Sigma-Aldrich) twice for 10 min and in a standard saline citrate solution (SSC 2X) for 10 min. All the buffers excepting DTT contained 0.2% of RNase inhibitor (Sigma-Aldrich). Sections were then placed overnight at 65°C in the hybridization buffer consisting of 150 mM NaCl, 8 mM Tris-HCl, 1 mM Tris-Base, 6 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, 50% formamide, 10% dextran sulphate, yeast tRNA (Sygma type III, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich), 0.02% ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone containing 0.5 µg/mL of the digoxigenin-labeled probe. Sections were washed in SSC 1X, 50% formamide, 0.1% Tween-20 twice for 20 min at 55°C and treated with 10 µg/µl RNase A (USB Corporation) in Tris 10 mM containing 1 mM EDTA and 500 mM NaCl for 15 min at 37°C. After 3 washes in PBST, sections were incubated overnight with an anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase (1:2000, Roche Diagnostic) in PBST containing 0.2% blocking agent (Roche Diagnostic). Then, they were washed twice in PBST, once in PBS 10 mM, and in a buffer containing 1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 500 mM MgCl₂, and 1% Tween-20. Each washing lasted 10 min. Sections were then incubated at 37°C in the same buffer containing nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (20 µl/ml, Roche Diagnostic). After ~4 h of incubation in the revelation buffer, sections were washed in PBST twice for 10 min. Finally, the sections were mounted on glass slides, dried and coverslipped with Vectamount (Vector Laboratories). Controls in the absence of primary antibodies (anti-FOS and anti-digoxigenin) or with the sense probe were run to ensure the specificity of the labelling.

vGLUT2, FOS, FOS-FG and NeuN immunohistochemistry

Sections of PSR rats were incubated in a rabbit antiserum to vGLUT2 (1:10000, Synaptic Systems) or to FOS (1:5000 for PSR lesion and sham rats, 1:10000 for PSR rats injected with FG, Merck) in PBST-Az for 3 days at 4°C. Then, sections were incubated in a biotinylated

antirabbit IgG solution (1:1000 in PBST, Vector Labs) and an ABC-HRP solution (1:1000 in PBST; Elite kit, Vector Labs) for 90 min at room temperature. Finally, sections were immersed in a 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB, Sigma), 0.003% H₂O₂ and 0.6% nickel ammonium sulphate to obtain a black reaction product. Sections were rinsed 3 times in PBST between each step. FOS stained sections of PSR rats injected with FG were incubated in the rabbit antiserum to FG (1:15000, US Biological) in PBST-Az for 3 days at 4°C. Then, sections were incubated in a biotinylated antirabbit IgG solution (1:1000 in PBST, Vector Labs) and an ABC-HRP solution (1:1000 in PBST, Elite kit, Vector Labs) for 90 min at room temperature before being immersed in a DAB solution without nickel to obtain a brown reaction product.

Sections at the level of the Sum in lesion and sham animals were incubated in a mouse antiserum to NeuN (1:20000, Chemicon), followed by an incubation in a biotinylated antimouse IgG solution (1:1000 in PBST, Vector Labs), ABC-HRP solution and DAB nickel. Sections were then mounted and counterstained with neutral red.

Analysis of the sleep wake states

Vigilance states were discriminated using EEG and EMG data as previously described (Sapin et al. 2009). State classification was done by a visual check of polygraphic signals. For each rat, the last 3 or 6 hours of EEG/EMG recordings before perfusion were analyzed by 5 sec epochs in order to determine quantities of waking (WK), slow wave sleep (SWS) and PS. WK was characterized by a low-amplitude EEG and a sustained EMG activity; SWS was identified by high-voltage slow waves (1.5– 4.0 Hz) and spindles (10–14 Hz) without phasic muscle activity; PS was characterized by theta rhythm (4–9 Hz) and muscle atonia. Hypnograms were obtained by using Spike-2 software (CED).

Analysis of immunostaining

The atlas of Swanson was used as a reference for all structures (Swanson 1992).

Drawings of double- or single-labelled sections were made with an Axioscope microscope (Zeiss) equipped with a motorized X–Y-sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator, ExploraNova). The number of double labelled FOS-vGLUT2+, FOS-vGAT+ and FOS-FG+ neurons was quantified on 2 hemi-sections at the level of the Sum for all animals (-4.45 and -4.60 mm to Bregma). The number of double-labelled FOS-FG+ neurons was also quantified on 2 hemi-sections at the level of the medial septum (MS) and the diagonal band nucleus (NBD, +0.10 and -0.26 mm to

Bregma), the lateral hypothalamic area (LHA, -3.25 and -3.90 mm to Bregma), the entorhinal cortex (ENT, -6.50 and -7.10 mm to Bregma) and the interpeduncular nucleus (IPN, -6.06 and -6.85 mm to Bregma).

In the DG, the number of FOS+ neurons and the level of expression of the vGLUT2 protein evaluated by optical density were quantified on 4 hemi-sections: -3.90 and -5 mm to Bregma for the dDG; -5.65 and -6.06 mm to Bregma for the vDG. Optical density was determined using ImageJ software in the granular layer of the DG and normalized using the DG molecular layer reading.

Statistical analysis

Analysis of variance (Kruskal-Wallis test following by Mann-Whitney tests) was performed on the different vigilance states, the number of labelled neurons and on the staining of vGLUT2 fibers for each structure across the experimental conditions (PSC, PSD, PSR, PSR-Sham and PSR-Lesion). All statistics were performed using Statview software.

Results

Quantification of Sleep

During the last 150 min before sacrifice, PSR animals used for FOS-vGLUT2 (n=4), FOS-vGAT (n=4) and FOS-FG experiments (n=4) spent significantly more time in PS than PSC (n=4) ($39.1 \pm 2.4\%$ and $7.05 \pm 1.8\%$, respectively, $P=0.0041$) and PSD (n=4) ($1.5 \pm 1.5\%$, $P=0.0041$) animals (Fig. 1c). PSD rats spent significantly less time in PS than PSC rats ($P=0.0433$, Fig. 1e, f). PSR animals exhibited significantly less WK ($18.3 \pm 3.4\%$) than PSC ($49.3 \pm 8.5\%$, $P=0.0188$) and PSD ($66.8 \pm 4.6\%$, $P=0.0041$) animals (Fig. 1a, b). No difference in SWS quantities was observed between the 3 groups of animals (PSC: $43.6 \pm 7.0\%$, PSD: $31.7 \pm 3.1\%$, PSR: $42.5 \pm 2.7\%$, $P=0.0873$, Fig. 1c, d). The PSR-lesioned (n=4) and sham rats (n=4) displayed the same amounts of PS, SWS and WK either in baseline condition ($P=0.1489$, $=0.3865$, $=0.3865$, respectively) or during PS hypersomnia ($P=0.0833$, >0.9999 , $=0.1489$, respectively).

Distribution of the FOS+, FOS/vGLUT2+ and FOS/vGAT+ double-labelled neurons in the supramammillary nucleus

To determine the level of activity of Sum neurons during PS hypersomnia, we quantified the number of neurons immunopositive for FOS in PSC (n=4), PSD (n=4) and PSR rats (n=4).

As previously shown (Renouard et al. 2015; Sapin et al. 2010), a large number of FOS-labelled cells was counted in the SumL specifically in PSR rats ($P=0.0308$, Table 1).

In contrast, a small and similar number of FOS labelled cells was observed between the three groups of animals in the SumM ($P=0.1462$, Table 1).

To identify the neurochemical nature of the Sum neurons activated during PS hypersomnia, we compared the distribution of FOS/vGLUT2+ neurons in PSC, PSD and PSR rats. No difference in the number of FOS/vGLUT2 double-labelled cells was observed in the SumM between the 3 groups of animals (PSC: 5.2 ± 3.3 , PSD: 15.2 ± 5 , PSR: 12 ± 4.4 , $P=0.2468$ (Table 1, Fig. 2a-c, e-f). In contrast, the number of FOS/vGLUT2 double-labelled cells was significantly higher in the SumL of PSR (94.5 ± 11.9) than of PSC (22 ± 8 , $P=0.0209$) and PSD animals (29.5 ± 11.5 , $P=0.0209$). The double-labelled cells in the SumL constituted 84.2% of the total number of FOS+ cells in PSR animals (Table 1, Fig. 2a-c, e-f). Since it has been shown that vGAT colocalizes with vGLUT2 in SumL neurons, we additionally counted the number of FOS/vGAT+ neurons in the Sum of another group of PSR rats ($n=4$). We found that 76% of the FOS+ cells located in the SumL were vGAT+ in PSR animals (109 ± 25.1 , Fig. 2d, g-h). In contrast, a few FOS-vGAT double-labelled neurons was observed in the SumM of PSR rats (5.5 ± 0.9).

Effect of Sum lesion on the distribution of the vGLUT2 labelled fibers in the dentate gyrus

We compared the level of expression of the vGLUT2 protein in the dDG and vDG of PSR rats with a bilateral iontophoretic injection of ibotenic acid ($n=4$) or NaCl ($n=4$) in the Sum. The Sum was left intact in PSR sham animals while it was entirely lesioned in those injected with ibotenic acid (Fig. 3i). In sham animals, a very high number of vGLUT2 immunoreactive fibers were localized in the supragranular layer of the DG whereas nearly no fibers were observed in the molecular and the polymorph layers (Fig. 3a, 4a).

In the PSR lesioned rats, very few vGLUT2+ fibers remained in the dDG and a strong reduction of the optic density (relative staining: 28.1 ± 3.6) was measured compared to PSR sham rats (relative staining: 100 ± 14.6 , $P=0.0209$, Fig. 3a-d, j). In contrast, only a small non significant decrease in the optic density was found in the vDG between the two groups of animals (PSR lesioned: 87.6 ± 7.4 , PSR sham: 100 ± 25.5 , $P=0.3865$, Fig. 4a-d, j). However, the distribution of vGLUT2 fibers was not similar in the vDG of lesioned and sham rats. Indeed, vGLUT2 staining strongly decreased specifically in the supragranular layer of the DG and remained similar in the granular layer itself (Fig. 4a-d).

Number of FOS+ neurons in the dorsal and ventral dentate gyrus of PSR rats with a Sum lesion

The number of FOS+ neurons was strongly and significantly decreased in the dDG of the lesioned compared to the sham rats (20.2 ± 6.4 versus 153.7 ± 18.8 , $P=0.0209$, Fig 3e-h, j, Fig. 4i). In contrast, only a small non significant decrease in the number of FOS+ neurons was observed in the vDG in the lesioned (235.2 ± 27.2) versus the sham rats (311 ± 23 , $P=0.0833$, Fig. 4e-j).

Localization of the FOS+ neurons projecting to the vDG in PSR animals

After FG injection in the vDG ($n=4$, Fig 5g), only a small number of double-labelled cells were observed in the SumL (4 ± 1.1). No or only a few number of double-labelled neurons were observed in other afferent structures to the vDG, like the medial septum (MS, 2.2 ± 0.6), the lateral hypothalamus (LHA, 4.5 ± 1.7), the SumM (0.5 ± 0.3), the lateral entorhinal cortex (ENTl, 3.2 ± 1.9) and the interpeduncular nucleus (IPN, 1.7 ± 0.6)(Fig 5h). In contrast, a very large number of double-labelled FG/FOS+ cells was observed in the medial entorhinal cortex (ENTm, 128.2 ± 32.4). The double-labelled cells constituted $37.2 \pm 7.4\%$ and $19 \pm 2.5\%$ of the total number of FG and FOS+ cells, respectively.

Discussion

We report here for the first time that around 80% of the FOS+ neurons localized in the SumL after PS hypersomnia express vGLUT2 or vGAT mRNA strongly suggesting that they are coexpressed in the same cells. We further demonstrate that all vGLUT2 fibers localized in the dorsal but not the ventral DG originate from the Sum. Besides, we show that the Sum is responsible for the activation of the dorsal but not the ventral DG granule cells during PS hypersomnia. Finally, we demonstrate that the ENTm contains a very large number of FOS+ neurons projecting to the vDG in PSR rats. Altogether, our results indicate that during PS hypersomnia GABA/glutamatergic neurons located in the SumL activate dDG granule cells while neurons located in ENTm activate vDG granule cells.

Our results complete and extend our previous studies showing in rats the presence of numerous FOS-labelled cells in the dorsal part of the DG and in the SumL after PS hypersomnia (Renouard et al. 2015; Sapin et al. 2010). We further show for the first time that 84 and 76% of the SumL FOS-labelled neurons express vGLUT2 and vGAT, respectively.

Although a technologically challenging triple staining would be necessary to directly prove it, our results strongly suggest that SumL neurons activated during PS have a dual GABA/glutamatergic phenotype. In agreement with our results, it has been shown that a large number of SumL neurons express GAD65 (Soussi et al. 2010). In addition, using retrograde tracing of [3H]D-aspartate from the DG, numerous labelled neurons have been observed in the SumL suggesting that the SumL-DG pathway is glutamatergic (Kiss et al. 2000). Further, 86% of the total number of retrogradely labelled neurons located in the SumL after an injection of a retrograde tracer in the dDG expresses GAD65 mRNA (Soussi et al. 2010). We also previously showed that 28% of the retrogradely labelled neurons in the SumL after a dorsal DG injection are FOS+ after PS hypersomnia (Renouard et al. 2015). Finally, it has been shown that all anterogradely labelled fibers localized in the DG after injection of an anterograde tracer in the SumL co-express vGAT, GAD65 and vGLUT2 clearly confirming that the SumL-DG pathway is both GABA and glutamatergic. Altogether, these results indicate that most SumL neurons projecting to the dDG including those activated during PS hypersomnia have a dual GABA/glutamate phenotype.

In addition, to determine whether SumL neurons are at the origin of all vGLUT2 fibers and induce FOS labelling after PS hypersomnia both in the dDG and vDG, we quantified the number of vGLUT2 fibers and FOS-labelled neurons in these two parts of the DG after full lesions of the Sum. Further, we determined whether the Sum contains retrogradely labelled FOS+ neurons after injection of Fluorogold in the vDG. We found out that Sum lesions induce a nearly complete disappearance and in contrast a non-significance decrease of FOS-labelled neurons in the dorsal and ventral part of the DG, respectively. vGLUT2-labelled fibers also completely disappeared in the dorsal but not in the ventral DG in which they specifically decreased in the supragranular but not in the granular layer itself. Finally, we found only a small number of FOS+ retrogradely labelled neurons in the SumL after injection of Fluorogold in the vDG. Our results are in line with previous studies showing by using anterograde tracer injection that the SumL project more densely to the dorsal than to the ventral DG (Ohara et al. 2013; Soussi et al. 2010; Vertes 1992). They also indicate that all vGLUT2 fibers present in the dorsal but not in the ventral DG originate from Sum neurons. In summary, our results clearly show for the first time that during PS hypersomnia, SumL neurons are fully responsible for the activation of dDG neurons while they play a minor role for that of the vDG neurons.

After injection of Fluorogold in the vDG, a high number of FOS+ retrogradely labelled neurons was specifically observed in the ENTm. Only a few double-labelled neurons were

observed in the other afferents to the vDG including the Sum. These results are in line with our previous data showing that the ENTm contains a very large number of FOS⁺ neurons during PS hypersomnia compared to PS deprivation and control conditions (Renouard et al. 2015). These results contrast with those obtained for the dDG showing that the SumL contains a large number of double-labelled cells while none were observed in the ENTm although it contained a large number of retrogradely labelled neurons (Renouard et al. 2015). Altogether, these results strongly suggest that the ENTm neurons are responsible for the activation of the vDG neurons during PS hypersomnia. These cells might also be at the origin of the remaining vGLUT2 innervation of the vDG after Sum lesion since the ENTm contains vGLUT2⁺ neurons (Wouterlood et al. 2008).

Functional significance

Our results strongly suggest that bipotential GABA/glutamatergic neurons of the SumL activate the granule cells of the dDG during PS hypersomnia. Further, it is likely that they are also responsible for the previously reported increased expression of BDNF, ARC and COX2 in the granule cells after PS hypersomnia (Renouard et al. 2015). The mechanisms responsible for increased expression of these early genes during PS hypersomnia remain to be determined. Indeed, the expression of FOS and that of the other early genes is generally induced by an increase in firing of the neurons (Yassin et al. 2010). However, activation of the SumL/dDG pathway should induce both the release of GABA and glutamate on dentate granule cells likely resulting in no change in firing rate. Recording of granule cells have shown that they are nearly not active during waking and that they are slightly more active during sleep (Neunuebel and Knierim 2012). Supporting the hypothesis that they do not increase their activity during PS, the downstream targets of DG granule cells, the CA3 neurons do not express FOS during PS hypersomnia (Renouard et al. 2015). In agreement with our results, LFP and unit activity recordings in the hippocampus showed enhanced dentate processing but limited CA3-CA1 coordination and a decrease in CA1 neurons firing rate during PS compared to SWS and WK (Montgomery et al. 2008). We propose that all SumL-dDG terminals corelease GABA and glutamate during PS but that facing GABAergic postsynaptic receptors are located only at somatic level of granule cells whereas NMDA and AMPA glutamatergic receptors are located at dendritic level. In such case, granule cells would be inhibited and therefore not able to generate spikes. However, the activation on DG cells of dendritic NMDA receptors by glutamate during PS hypersomnia could induce calcium entry, activation of the

MAP kinase pathway and be responsible for the transcription of immediate early genes including FOS as previously described (Lerea and McNamara 1993). Additional studies on DG neurons across the sleep-waking cycle using calcium imaging, multiunit multisites recordings and optogenetics are needed to test such a hypothesis.

The function of the activation of DG granule cells during PS also remains to be determined. The DG is thought to play a key role in the formation of the contextual component of fear memories by discriminating similar contexts (McHugh et al. 2007). Using early genes expression mapping, it has been shown that the same small group of DG granule cells (2-4%) is activated every time the animal is exposed to the same context while different environments or tasks activate different populations of DG granule cells (Schmidt et al. 2012). Further, it has recently been shown that optogenetic reactivation of DG granule cells activated during fear conditioning is sufficient to induce freezing behaviour (Liu et al. 2012). Conversely, inactivating DG granule cells that were activated during fear conditioning by optogenetic impairs the expression of the fear memory as evidenced by the lower percentage of freezing when exposing the animals to the same context (Denny et al. 2014). On the other hand, it has been shown that contextual fear conditioning is impaired after PS deprivation (Ravassard et al. 2016) or inhibition of theta rhythm during PS by optogenetic silencing of medial septum GABAergic neurons (Boyce et al. 2016). Altogether, these and our results strongly suggest that activation of DG granule cells during PS plays a role in the consolidation of emotional and spatial memory.

Our results further show that dorsal and ventral DG granule cells are activated during PS by SumL and ENTm neurons, respectively. Interestingly, it has been demonstrated that DG granule cells have different functions along the dorsoventral axis of the hippocampus: dDG neurons seem to control exploratory behavior and encoding of contextual fear memories, while vDG neurons are more implicated in anxiety-related behavior (Kheirbek et al. 2013). Additional studies using optogenetic inhibition and activation of the granule cells of the ventral and dorsal DG activated during PS are necessary to determine whether they play a role in contextual fear memory consolidation and anxiety regulation.

In conclusion, our data strongly suggest that GABA/glutamatergic neurons of the SumL and cortical neurons of the ENTm are responsible for the activation of dorsal and ventral DG granule cells during PS hypersomnia, respectively. Our results open the way to the identification of the functional role of such differential activation of the ventral and dorsal DG granule cells during PS using advanced methods such as optogenetics.

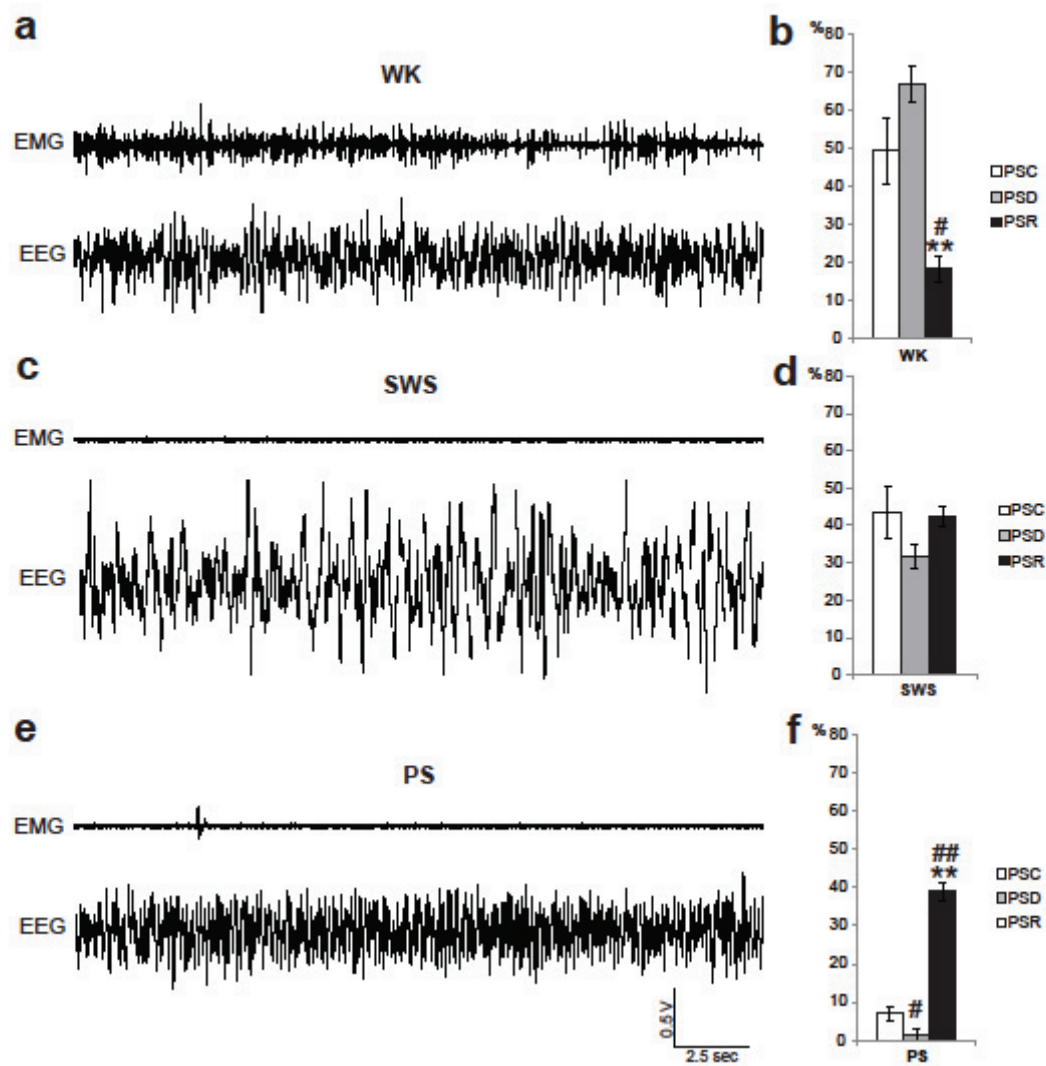
- Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A (2016) Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation *Science* 352:812-816 doi:10.1126/science.aad5252
- Denny CA et al. (2014) Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis *Neuron* 83:189-201 doi:10.1016/j.neuron.2014.05.018
- Gandrillon O, Solari F, Legrand C, Jurdic P, Samarut J (1996) A rapid and convenient method to prepare DIG-labelled RNA probes for use in non-radioactive in situ hybridization *Mol Cell Probes* 10:51-55 doi:10.1006/mcpr.1996.0007
- Jouvet M, Michel F, Courjon J (1959) Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique *CR Seances Soc Biol* 153:1024-1028
- Kheirbek MA et al. (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus *Neuron* 77:955-968 doi:10.1016/j.neuron.2012.12.038
- Kiss J, Csaki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranth C (2000) The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [³H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study *Neuroscience* 97:657-669 doi:S0306452200001275 [pii]
- Lerea LS, McNamara JO (1993) Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-fos transcription by distinct calcium-requiring intracellular signaling pathways *Neuron* 10:31-41
- Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S (2012) Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall *Nature* 484:381-385 doi:10.1038/nature11028
- McHugh TJ et al. (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network *Science* 317:94-99 doi:10.1126/science.1140263
- Montgomery SM, Sirota A, Buzsaki G (2008) Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep *J Neurosci* 28:6731-6741 doi:28/26/6731 [pii]
- Neunuebel JP, Knierim JJ (2012) Spatial firing correlates of physiologically distinct cell types of the rat dentate gyrus *J Neurosci* 32:3848-3858 doi:10.1523/JNEUROSCI.6038-11.2012
- Ohara S, Sato S, Tsutsui K, Witter MP, Iijima T (2013) Organization of multisynaptic inputs to the dorsal and ventral dentate gyrus: retrograde trans-synaptic tracing with rabies virus vector in the rat *PLoS One* 8:e78928 doi:10.1371/journal.pone.0078928
- Ravassard P et al. (2016) REM Sleep-Dependent Bidirectional Regulation of Hippocampal-Based Emotional Memory and LTP *Cereb Cortex* 26:1488-1500 doi:10.1093/cercor/bhu310
- Renouard L et al. (2015) The supramammillary nucleus and the claustrum activate the cortex during REM sleep *Science Advances* 1 doi:10.1126/sciadv.1400177
- Sapin E, Berod A, Leger L, Herman PA, Luppi PH, Peyron C (2010) A Very Large Number of GABAergic Neurons Are Activated in the Tuberal Hypothalamus during Paradoxical (REM) Sleep Hypersomnia *PLoS One* 5:e11766 doi:10.1371/journal.pone.0011766
- Sapin E et al. (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep *PLoS ONE* 4:e4272 doi:10.1371/journal.pone.0004272
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ (2012) Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation *Behav Brain Res* 226:56-65 doi:10.1016/j.bbr.2011.08.039

- Soussi R, Zhang N, Tahtakran S, Houser CR, Esclapez M (2010) Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences *Eur J Neurosci* 32:771-785 doi:EJN7329 [pii]
- Swanson LW (1992) *Brain maps : structure of the rat brain*. Elsevier, New York
- Verret L et al. (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep *BMC Neurosci* 4:19
- Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat *J Comp Neurol* 326:595-622
- Wouterlood FG et al. (2008) Origin of calretinin-containing, vesicular glutamate transporter 2-coexpressing fiber terminals in the entorhinal cortex of the rat *J Comp Neurol* 506:359-370 doi:10.1002/cne.21555
- Yassin L, Benedetti BL, Jouhannau JS, Wen JA, Poulet JF, Barth AL (2010) An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex *Neuron* 68:1043-1050 doi:S0896-6273(10)00971-2 [pii]

Tables and Figures:

	PSC	PSD	PSR
SumM			
FOS +	14,2 ± 8,1	40,2 ± 10,4	22,5 ± 1,8
FOS/vGLUT2 +	5,2 ± 3,3	15,2 ± 4,6	12 ± 4,4
vGLUT2 +	8,2 ± 2,4	8,7 ± 3,7	2,2 ± 1,3
% FOS/vGLUT2 +	36,8 ± 12,3	37,9 ± 9,5	53,3 ± 17,5
SumL			
FOS +	37 ± 16,5	56 ± 19,4	112,2 ± 11,7 * #
FOS/vGLUT2 +	22 ± 7,9	29,5 ± 11,5	94,5 ± 11,9 * #
vGLUT2 +	59,5 ± 12,3	58,7 ± 12,1	33 ± 10,1
% FOS/vGLUT2 +	59,5 ± 10,7	52,7 ± 11,2	84,2 ± 4,3

Table 1. Total number of FOS+, FOS/vGLUT2+, vGLUT2+ neurons and percentage of FOS/vGLUT2+ neurons in the supramammillary nucleus of control (PSC), PS deprived (PSD) and hypersomniac (PSR) rats. The neurons were counted on 2 hemi-sections per animal. Values are mean±SEM across 4 animals per group. Significance: Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. * p<0.05 PSR vs PSC, # p<0.05 PSR vs PSD. Abbreviations: SumM: medial supramammillary nucleus, SumL: lateral supramammillary nucleus.



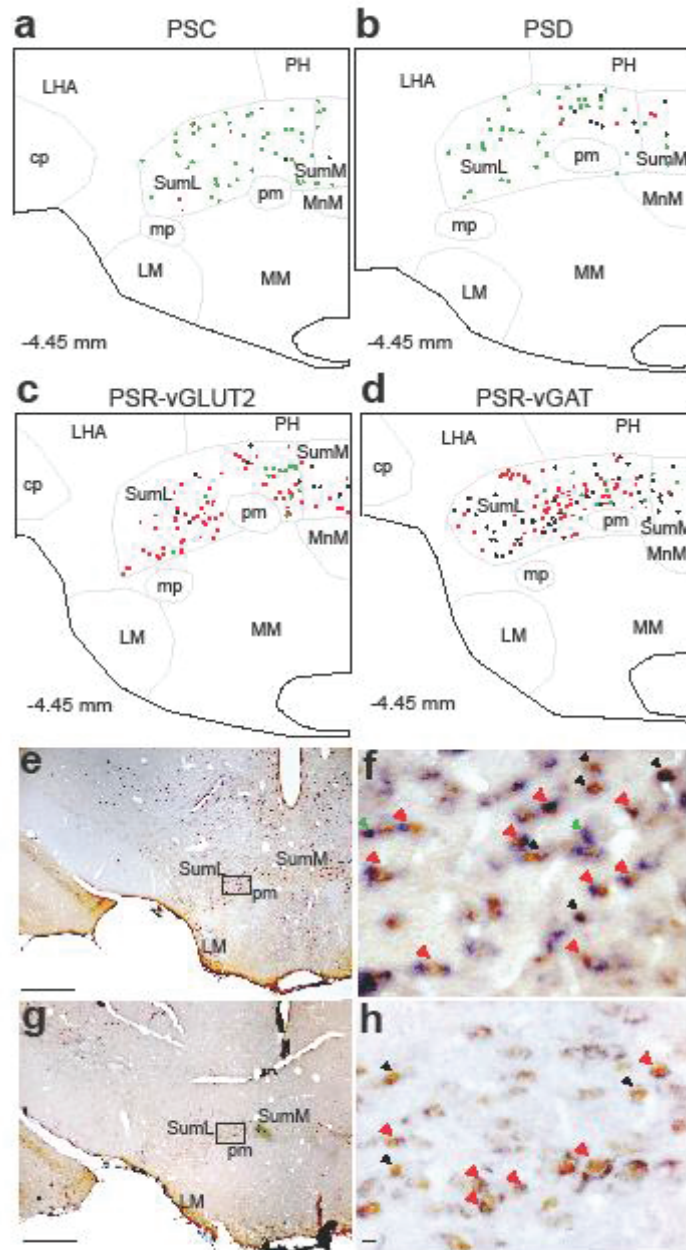


Figure 2. SumL neurons expressing FOS after PS recovery are glutamatergic and GABAergic. **(a-c)** Schematic distribution of singly FOS+ (black dots), singly vGLUT2+ (green dots) and FOS-vGLUT2 double-labelled (red squares) neurons on a coronal section in a representative animal for PSC (a), PSD (b) and PSR (c) conditions. **(d)** Schematic distribution of singly FOS+ (black dots), singly vGAT+ (green dots) and FOS-vGAT double-labelled (red squares) neurons on a coronal section in a representative PSR animal. **(e)** Photomicrographs showing FOS (brown nuclear staining) and vGLUT2 (blue diffuse cytoplasmic staining) double-stained neurons in the SumL of a PSR rat. **(f)** shows the area inside the rectangle in (e) at a higher magnification. Note the dense cluster of double-labelled neurons in the SumL (red arrowheads). The black and green arrowheads indicate the FOS+ and the vGLUT2+ singly labelled neurons, respectively. **(g)** Photomicrographs showing FOS (brown nuclear staining) and vGAT (blue diffuse cytoplasmic staining) double-stained neurons in the SumL of a PSR rat. **(h)** shows the area inside the rectangle in (f) at a higher magnification. Note the dense cluster of double-labelled neurons in the SumL (red arrowheads). The black arrowheads indicate the FOS+ singly labelled neurons. Abbreviations: cp: cerebral peduncle; LHA: lateral hypothalamic area; LM: lateral mammillary nucleus; MM: medial mammillary nucleus, medial part; MnM: medial mammillary nucleus, median part; PH: posterior hypothalamic nucleus; pm: principal mammillary tract; SumL: lateral supramammillary nucleus; SumM: medial supramammillary nucleus. Scale bars: 500 μm for (e, g) and 50 μm for (f, h).

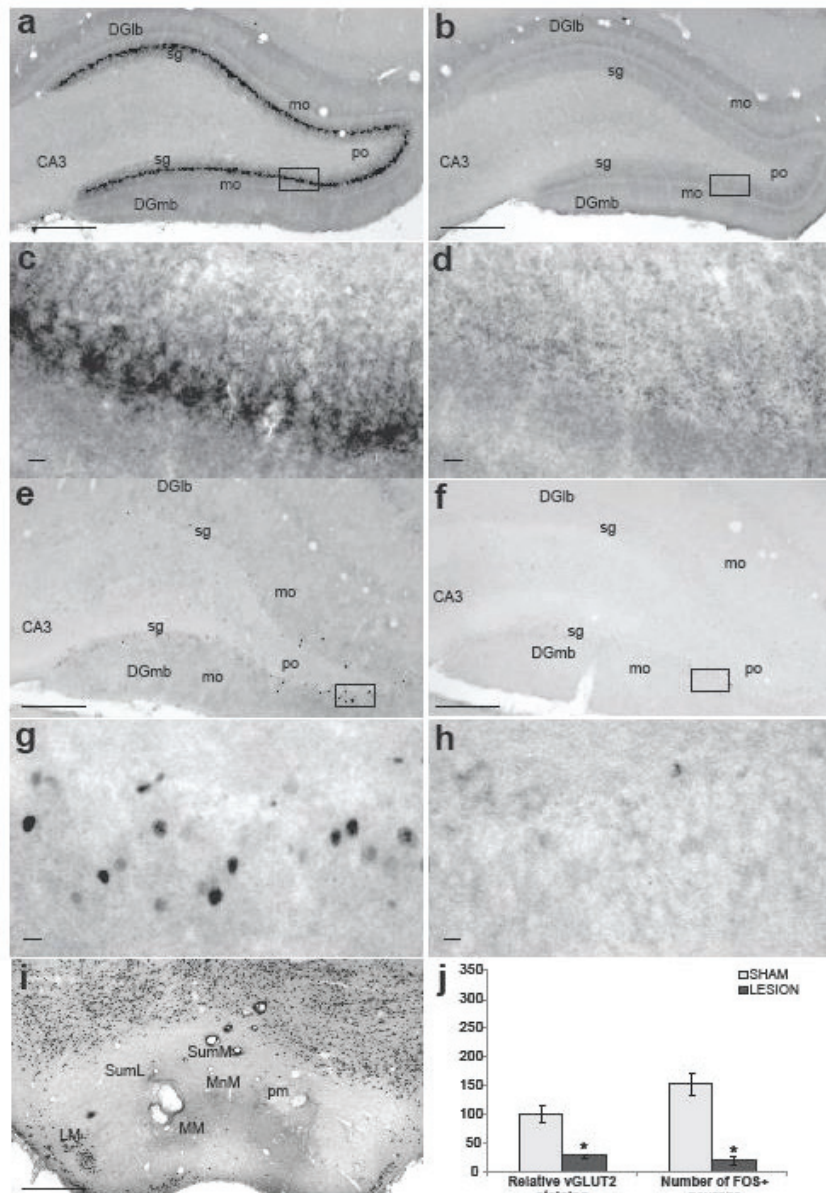


Figure 3. vGLUT2+ fibers and FOS+ neurons are absent in the dorsal DG (dDG) after lesion of the Sum. **(a-d)** Photomicrographs showing vGLUT2 immunostained sections at the level of the dDG in a PSR sham (a, c) and a PSR rat with a lesion of the Sum (b, d). (c) and (d) show the area inside the rectangle in (a) and (b) at a higher magnification. The Sum lesion causes a dramatic reduction in the number of vGLUT2+ fibers in the dDG. **(e-h)** Photomicrographs showing FOS immunostained sections at the level of the dDG in a PSR sham (e, g) and a PSR rat with a lesion of the Sum (f, h). (g) and (h) show the area inside the rectangle in (e) and (f) at a higher magnification. The Sum lesion causes a dramatic reduction in the number of FOS+ neurons in the dDG. **(i)** Illustration of a representative neurotoxic lesion of the Sum on a section immunostained with NeuN. **(j)** Mean±SEM optic density of vGLUT2 staining and number of FOS+ neurons in dDG in rats with a Sum lesion (n=4) relative to PSR sham animals (n=4). Significance: Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. * p<0.05. Abbreviations: CA3: field CA3, Ammon's Horn; DGlb: dentate gyrus, lateral blade; DGlb-mo: dentate gyrus, lateral blade-molecular layer; DGlb-sg: dentate gyrus, lateral blade-granule cell layer; DGmb: dentate gyrus, medial blade; DGmb-mo dentate gyrus, medial blade-molecular layer; DGmb-po: dentate gyrus, medial blade-polymorph layer; DGmb-sg: dentate gyrus, medial blade-granule cell layer; LM: lateral mammillary nucleus; MM: medial mammillary nucleus, medial part; MnM: medial mammillary nucleus, median part; pm: principal mammillary tract; SumL: lateral supramammillary nucleus; SumM: medial supramammillary nucleus; V3: third ventricle. Scale bars: 500 μ m for (a, b, e, f, i); 50 μ m for (c, d, g, h).

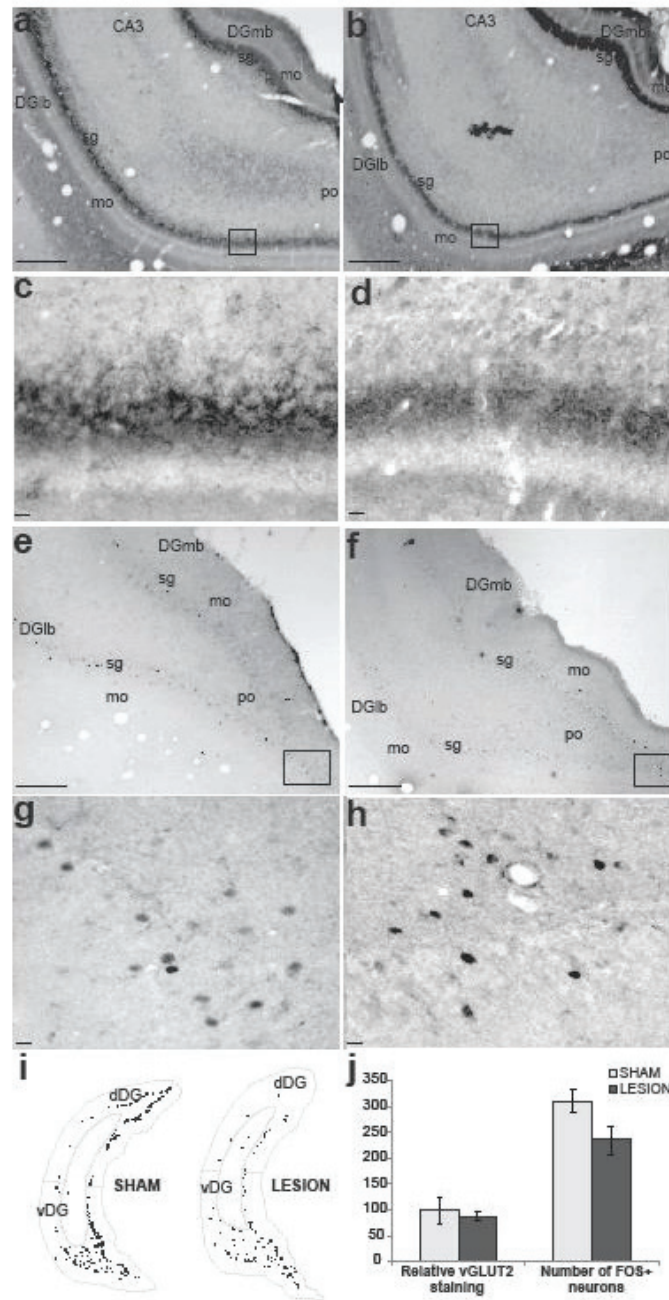


Figure 4. vGLUT2+ fibers and FOS+ neurons are present in the ventral DG (vDG) after lesion of the Sum. **(a-d)** Photomicrographs showing the vGLUT2 staining in a representative PSR sham (a, c) and a PSR rat with a Sum lesion (b, d). The Sum lesion does not induce a significant reduction in the number of vGLUT2+ fibers in the vDG. (c) and (d) show the area inside the rectangle in (a) and (b) at a higher magnification. **(e-h)** Photomicrographs showing FOS immunostained sections at the level of the vDG in a PSR sham (e, g) and a PSR rat with a lesion of the Sum (f, h). (g) and (h) show the area inside the rectangle in (e) and (f) at a higher magnification. The Sum lesion does not cause a reduction in the number of FOS+ neurons in the vDG. **(i)** Schematic distribution of FOS+ (black dots) neurons in the dDG and vDG on a coronal section in a sham (left) and a lesioned (right) rat. Note the strong decrease in the number of FOS+ neurons in the dDG but not the vDG. **(j)** Mean \pm SEM optic density of vGLUT2 staining and number of FOS neurons in vDG in rats with a Sum lesion (n=4) relative to PSR sham animals (n=4). Abbreviations: CA3: field CA3, Ammon's Horn; dDG: dorsal dentate gyrus; DGlb: dentate gyrus, lateral blade; DGlb-mo: dentate gyrus, lateral blade-molecular layer; DGlb-sg: dentate gyrus, lateral blade-granule cell layer; DGmb: dentate gyrus, medial blade; DGmb-mo: dentate gyrus, medial blade-molecular layer; DGmb-po: dentate gyrus, medial blade-polymorph layer; DGmb-sg: dentate gyrus, medial blade-granule cell layer; vDG: ventral dentate gyrus. Scale bars: 500 μ m for (a, b, e, f); 50 μ m for (c, d, g, h).

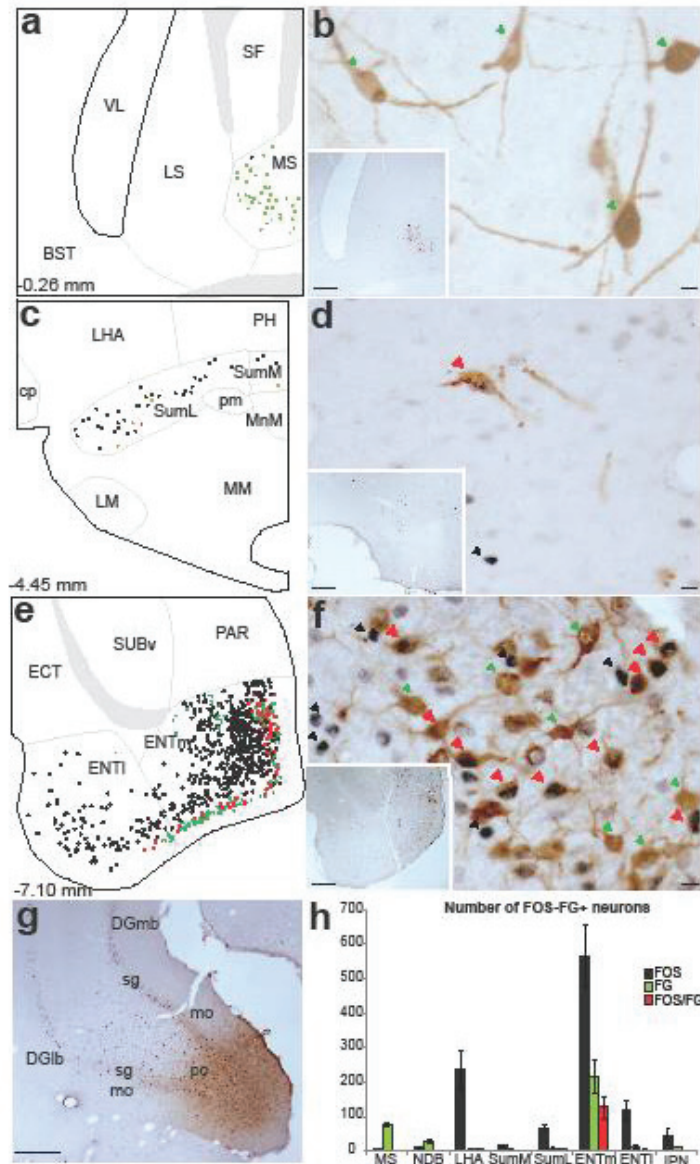


Figure 5. The FOS+ neurons projecting to the vDG in PSR animals are mostly located in the medial entorhinal cortex. **(a, c, e)** Schematic distribution of singly FOS+ (black dots), singly FG+ (green dots) and FOS-FG double-labelled (red squares) neurons in the medial septum (a), the Sum (c) and the entorhinal cortex (e) in a representative PSR animal. **(b, d, f)** Photomicrographs showing FOS (black nuclear staining) and FG (brown cytoplasmic staining) double-stained neurons in the medial septum (b), the Sum (d) and the entorhinal cortex (f) of a PSR rat. Note the dense cluster of double-labelled neurons in the medial entorhinal cortex (red arrowheads). The black and green arrowheads indicate the FOS+ and FG+ singly labelled neurons, respectively. **(g)** Photomicrograph showing a representative FG injection in the vDG. **(h)** Mean±SEM number of FOS/FG+ cells contained in the structures projecting to the vDG. Abbreviations: BST: bed nuclei stria terminalis; cp: cerebral peduncle; DGLb: dentate gyrus, lateral blade; DGLb-mo: dentate gyrus, lateral blade-molecular layer; DGLb-sg: dentate gyrus, lateral blade-granule cell layer; DGmb: dentate gyrus, medial blade; DGmb-mo: dentate gyrus, medial blade-molecular layer; DGmb-po: dentate gyrus, medial blade-polymorph layer; DGmb-sg: dentate gyrus, medial blade-granule cell layer; ECT: entorhinal area; ENTl: entorhinal area, lateral part; ENTm: entorhinal area, medial part; IPN: interpeduncular nucleus; LHA: lateral hypothalamic area; LM: lateral mammillary nucleus; LS: lateral septal nucleus; MS: medial septal nucleus; MM: medial mammillary nucleus, medial part; MnM: medial mammillary nucleus, median part; NDB: diagonal band nucleus; PAR: parasubiculum; PH: posterior hypothalamic nucleus; pm: principal mammillary tract; SF: septofimbrial nucleus; SUBv: subiculum, ventral part; SumL: lateral supramammillary nucleus; SumM: medial supramammillary nucleus; VL: lateral ventricle. Scale bars: 500 µm for (b, d, f, g); 50 µm for the insets.

ETUDE 3. Rôle pendant le SP de la projection du Sum sur le GD

Pour caractériser fonctionnellement la voie neuronale Sum-GD pendant le SP, nous avons mis en place au laboratoire la technique d'optogénétique, qui permet de manipuler les neurones d'intérêt ciblés moléculairement avec une résolution spatiale et temporelle très fine.

Etant donc une mise au point, nous avons rencontré plusieurs problèmes techniques au cours de nos expériences et donc très souvent nous avons changé de méthodologies. Nous avons ainsi obtenu les premiers résultats positifs depuis pas long temps et les expériences sont à continuer. Pourtant, aujourd'hui nous pouvons affirmer que la technique d'optogénétique est opérationnelle au laboratoire.

Matériels et méthodes

1. L'optogénétique

1.1 Principe

Aujourd'hui, l'application de la méthode d'optogénétique en neurosciences constitue sans nul doute une avancée révolutionnaire qui va nous permettre d'atteindre une compréhension sans précédent de la fonction des circuits neuronaux dans le comportement animal. Cette technique, élue méthode de l'année par Nature Methods en 2010, permet un contrôle spatial et temporel de l'activité de types spécifiques de neurones dans le cerveau vivant.

Les neurones sont d'abord génétiquement modifiés pour exprimer des protéines sensibles à la lumière (opsines). Lorsque ces neurones sont ensuite illuminés avec la lumière de la fréquence correcte, ils sont inhibés ou activés de manière transitoire ou leurs voies de signalisation sont modulées en fonction du type particulier de l'opsine qu'ils expriment. L'expression de l'opsine dans un type cellulaire spécifique est généralement obtenue avec l'utilisation d'animaux transgéniques, de vecteurs viraux ou une combinaison des deux, et l'application ponctuelle de la lumière permet de moduler l'activité de régions spécifiques du cerveau. La méthode d'optogénétique, utilisée pour la première fois il y a une décennie (Boyden et al., 2005), a été largement développée au cours des dernières années et continue de progresser avec l'introduction d'opsines de plus en plus évoluées et fonctionnelles.

1.2 Opsines

Les opsines sont des protéines transmembranaires à 7 hélices qui modifient l'activité de la cellule dans laquelle elles sont exprimées lorsque la cellule est exposée à la lumière.

Pour fonctionner, les opsines nécessitent du rétinal, une forme de vitamine A qui fait une isomérisation lors de l'absorption d'un photon. Le complexe opsine-rétinal forme ainsi une molécule mixte appelée rhodopsine. L'activation du rétinal par la lumière induit un changement de la conformation de l'opsine qui provoque une modification du potentiel de membrane et l'activation ou l'inhibition de l'activité neuronale.

Les Channelrhodopsines (ChRS) sont des canaux ioniques lumière-dépendants découverts dans les algues vertes unicellulaires (Nagel et al., 2003, 2005). La plus utilisée des CHRS est la channelrhodopsine-2 (ChR2), un canal cationique dérivant de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* qui, lorsqu'il est éclairé par la lumière bleue (470 nm), s'ouvre et permet le passage de cations et la dépolarisation de la cellule (**Figure 1A**; Nagel et al., 2003, 2005, Boyden et al., 2005).

Les opsines inhibitrices plus utilisées sont l'Halorhodopsine (NpHR) et l'Archeorhodopsine (Arch). L'NpHR, découverte dans l'algue *Natronomonas pharaonis* (Han et Boyden, 2007; Zhang et al., 2007), est une pompe qui fait rentrer des ions chlorure dans la cellule lors de l'activation de lumière, ce qui entraîne une hyperpolarisation. eNpHR3.0 est une forme évoluée de NpHR avec une meilleure conductance de membrane, des niveaux plus hauts d'expression et des photocourants plus robustes (Gradinaru et al., 2008; Zhao et al., 2008).

Avec un maximum d'excitation à 590 nm, eNpHR3.0 peut être activée par des longueurs d'onde verte, jaune, rouge (**Figure 1A**). Cependant, l'accumulation d'ions chlore dans le milieu intracellulaire peut conduire d'une part à une augmentation du potentiel d'inversion du chlore (et donc le canal devient de moins en moins hyperpolarisant) et d'autre part contribue à rendre les courants GABA-A excitateurs lorsque la photostimulation s'arrête: les récepteurs GABA A sont perméables au Cl⁻, donc l'entrée massive de ces ions dans la cellule peut provoquer une chute du gradient du Cl⁻ qui induit la formation de courant GABA excitateurs. En effet il a été montré qu'après stimulation avec la lumière jaune, les cellules exprimant NpHR augmentent leur probabilité de décharger (**Figure 1B**; Tsunematsu et al., 2011; Raimondo et al., 2012). Par ailleurs, l'hyperpolarisation induite par eNpHR3.0 n'est pas constante dans le temps: si au début de la stimulation une inhibition de la décharge neuronale est observée, au bout d'environ 1 min des potentiels d'action commencent à réapparaître (**Figure 1C**; Tsunematsu et al., 2011).

C'est pour cette raison que de plus en plus l'Arch. est utilisée pour l'inhibition spécifique de neurones. Cette opsine, dérivant de *Halorubrum sodomense*, est une pompe proton dont l'activation entraîne un courant sortant d'ions H⁺, donc une diminution du pH intracellulaire et une augmentation du pH extracellulaire au voisinage de la cellule stimulée (Chow et al., 2010; Gradinaru et al., 2010; Han et al., 2011). Arch présente un maximum d'excitation entre 520 et 550 nm (**Figure 1A**).

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé ChR2 et eNpHR3.0.

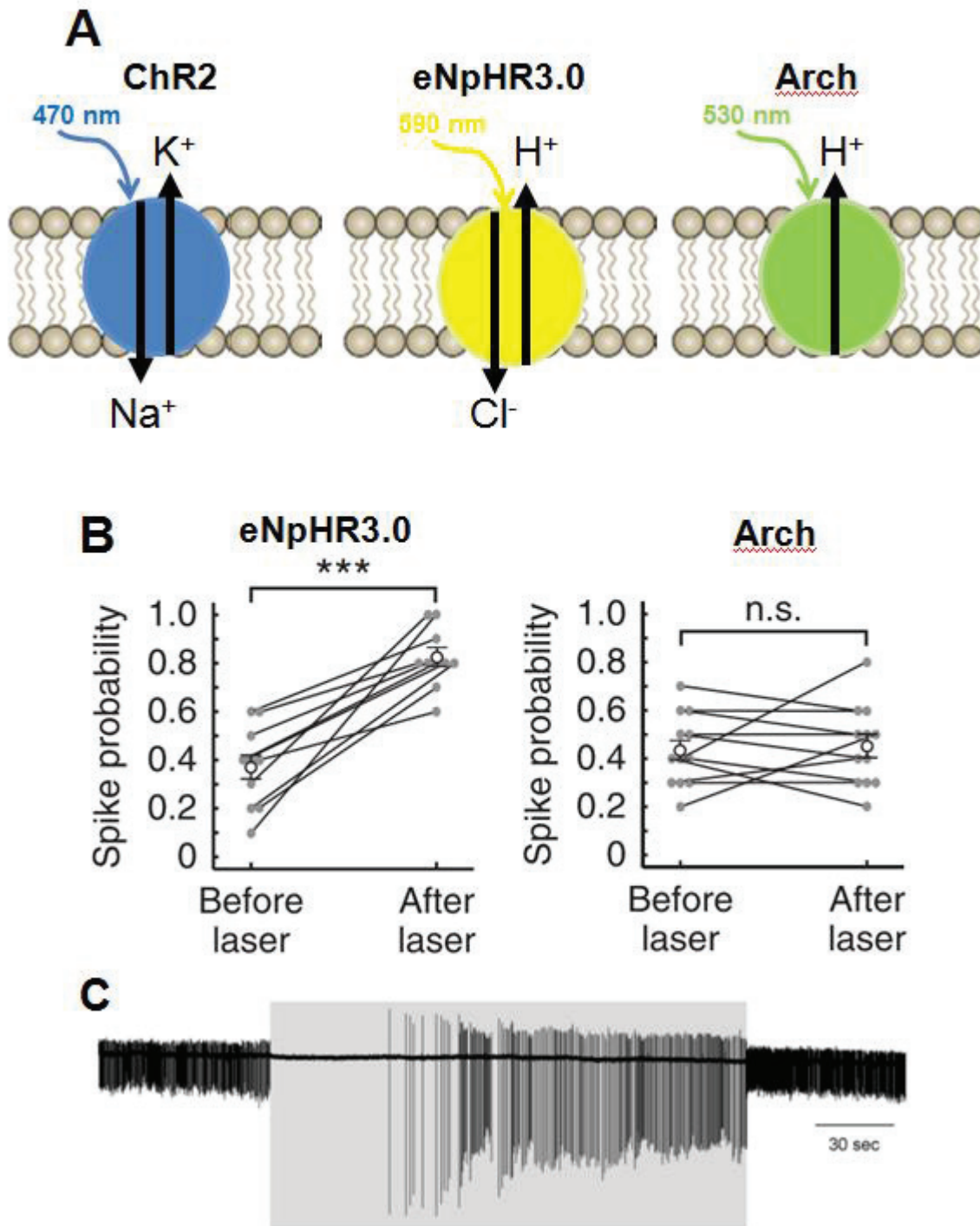


Figure 1. Opsines.

- (A) La Channelrhodopsine-2 (ChR2) éclairée par la lumière bleue (470 nm), s'ouvre et permet le passage de cations; l'Halorhodopsine (eNpHR3.0) fait rentrer des ions chlorure dans la cellule alors que l'Archaeorhodopsine (Arch.) fait sortir des ions H⁺ lors de l'application de lumière jaune/verte (590/530 nm).
- (B) Probabilité de décharge des neurones transfectés avec eNpHR3.0 (n=10) et Arch. (n=12) après stimulation de 15 s à 532 nm et 7.9 mW mm⁻²; p<0.001 (Raimondo et al., 2012).
- (C) Enregistrement en vitro d'une cellule exprimant eNpHR3.0. L'illumination pendant 3 min inhibe la décharge neuronale, mais au bout d'environ 1 min les potentiels d'action réapparaissent (Tsunematsu et al., 2011).

1.3 Vecteurs viraux

L'expression spécifique des opsines dans les neurones d'intérêt est obtenue à l'aide de vecteurs viraux. En utilisant cette approche, un virus modifié contenant un gène d'opsine avec un promoteur spécifique est injecté dans la région d'intérêt et ainsi l'opsine s'exprime dans les neurones cibles. Divers vecteurs viraux tels que les lentivirus, les vecteurs viraux adéno-associés, le virus de la rage peuvent être utilisés pour induire l'expression spécifique des opsines chez la souris, le rat, le poisson-zèbre, et des modèles de primates (Zhu et al., 2009; Zhang et al., 2010).

Le vecteur viral que nous avons utilisé au cours de cette thèse est un vecteur viral adéno-associé modifié (AAV). Les AAV sont des petits virus (environ 25 nm de diamètre) à ADN simple brin qui se trouvent naturellement dans les tissus. Ils sont incapables de se répliquer sans l'aide d'un «helper virus» et, dans ce cas, ils restent latents dans les cellules sous forme épisomale (molécule d'ADN localisé en dehors du chromosome). Dans notre cas, les AAV sont modifiés (recombinants) pour qu'ils aient un tropisme préférentiel pour les neurones, qu'ils soient non répliatifs et qu'ils ne provoquent pas la dégénérescence des neurones. L'ADN des AAV est long 4.7 kb et est constitué par deux phases de lecture ouvertes «open reading frame», ORF). L'ORF de gauche (rep) code pour les protéines rep nécessaires à la répliation de l'AAV; l'ORF de droite (cap) code pour les protéines de la capsid. Les ORF sont flanqués par des répétitions terminales inversées (ITR), des séquences d'environ 145 bp qui permettent de former la structure en épingle à cheveu nécessaire à l'intégration de l'ADN de l'AAV dans le génome de la cellule d'accueil.

La capsid des AAV est constituée de 60 copies de 3 protéines appelées VP1, VP2 et VP3, dans un rapport de 1:1:18 (Wu et al., 2006). Ils existent plusieurs sérotypes d'AAV, qui diffèrent essentiellement dans la composition de la capsid. Les différents sérotypes n'interagissent pas de la même manière avec les cellules, et l'efficacité de leur infection et, en conséquence, de la transduction dépend donc du sérotype utilisé. Par exemple, les AAV5 et 9 présentent une meilleure transfection au niveau du SNC par rapport aux autres AAVs (Wu et al., 2006; McCown 2011; Aschauer et al., 2013). Une fois l'AAV injecté dans le cerveau, sa capsid interagit avec les glycosaminoglycanes de la membrane plasmique qui fonctionnent comme des récepteurs. Ensuite, la capsid interagit avec des corécepteurs, qui règlent les étapes successives de trafic intracellulaire. L'AAV2 interagit avec les protéoglycanes de sulfate d'héparane, alors que l'AAV5 a besoin d'acide sialique pour adhérer à la cellule et

pouvoir être transduit. L'AAV subit ensuite une endocytose en présence de clatrine et de dynamine. L'AAV5 après endocytose est transporté principalement au trans-Golgi, ce que suggère que ce sérotype utilise un type différent d'endocytose par rapport aux autres sérotypes (Bantel-Schaal et al., 2002). Les mécanismes qui règlent le désassemblage de l'AAV et son transport dans le noyau ne sont pas connus. Probablement le désassemblage de la capside a lieu suite à l'interaction de l'AAV avec des protéines de la membrane nucléaire, et ces interactions pourraient être différentes selon le sérotype. Par exemple, Thomas et al. (Thomas et al., 2004) ont proposé que le désassemblage rapide de l'AAV8 pourrait contribuer à la transduction plus élevée et rapide de ce sérotype dans le foie par rapport à l'AAV2.

1.4 Système inducible Cre

Certains promoteurs ont une activité transcriptionnelle plutôt basse, et sont donc inefficaces pour induire un niveau d'expression du gène de l'opsine suffisant pour obtenir une activation ou inhibition de l'activité neuronale; par ailleurs, la longueur du matériel génétique d'un vecteur viral est modeste, ce qui limite la taille du promoteur et réduit ainsi la diversité des types de cellules qui peuvent être spécifiquement transfectées. Ainsi, la stratégie utilisée actuellement pour cibler des types de cellules génétiquement définis et amplifier l'activité transcriptionnelle prévoit l'utilisation de lignées de souris à base de Cre-recombinase en combinaison avec les vecteurs viraux. La Cre-recombinase est une enzyme qui catalyse la recombinaison entre deux sites loxP (séquences de 34 bp) qui flanquent un gène d'intérêt. Selon l'orientation de ces sites, le matériel génétique situé entre eux sera inversé lorsque l'enzyme Cre-recombinase est présente. Typiquement, un vecteur viral contenant un gène inversé et "floxed" (flanqué de loxP) est injecté localement dans la région du cerveau d'intérêt chez des souris transgéniques ou knock-in exprimant la Cre-recombinase dans un type de cellule spécifique. Même si le vecteur viral peut infecter toutes les cellules, l'opsine sera retournée à l'orientation correcte et sera donc fonctionnelle seulement dans le type de cellule qui contient la Cre-recombinase. Grâce à cette méthode, une ligne Cre de souris peut être utilisée pour de nombreux types d'expériences avec beaucoup d'opsines différents en changeant seulement le vecteur viral, une considération importante compte tenu de la vitesse actuelle de développement des opsines (Zhang et al., 2010).

Pendant ma thèse, j'ai utilisé un AAV Cre-dépendant qui contient entre 2 sites lox le gène inversé de l'opsine et un gène rapporteur EYFP de 720 bp (**Figure 3**). Ce gène code pour la protéine fluorescente jaune EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein, longueur d'onde d'excitation à 515 nm et longueur d'onde d'émission à 529 nm) qui sera exprimé dans le cytoplasme, les axones et les dendrites des cellules infectées, permettant ainsi leur localisation exacte et l'estimation de la taille des sites d'injection de l'AAV. Nous avons aussi utilisé un AAV contrôle, qui contient entre les 2 sites lox seulement le gène rapporteur, sans celui codant pour l'opsine. Le vecteur viral est acheté déjà prêt chez UNC Gene Therapy Center (pour ChR2: UNC GTC Vector Core, rAAV2/EF1a-DIO-hChR2-(H134R)-eYFP; pour eNpHR3.0: UNC GTC Vector Core, rAAV2/EF1a-DIO- eNpHR3.0-eYFP; pour l'AAV contrôle: UNC GTC Vector Core, rAAV2/EF1a-DIO-eYFP).

Nous avons utilisé des souris transgéniques knock-in Cre-vGLUT2, qui contiennent donc la Cre-recombinase spécifiquement dans les neurones exprimant vGLUT2, c'est-à-dire les neurones glutamatergiques. Nous avons injecté le vecteur viral dans le Sum. De cette manière seulement les neurones glutamatergiques du Sum ont été transfectés avec le vecteur et ont donc exprimé l'opsine.

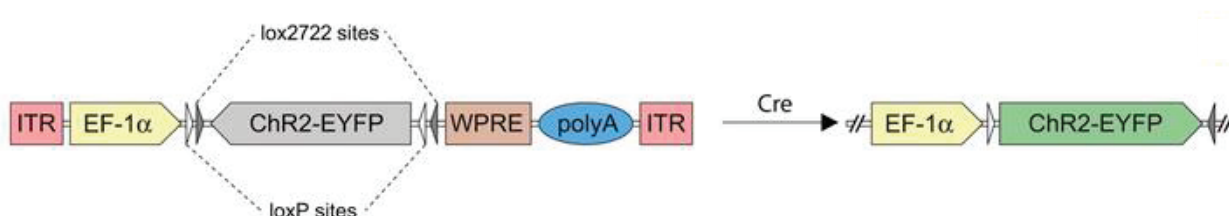


Figure 3. Schéma de l'AAV Cre-dépendant.

Le gène d'intérêt (dans l'exemple, celui pour la ChR2 et le gène rapporteur EYFP) est flanqué par deux sites lox. En présence de la Cre-recombinase, ChR2-EYFP est inversé et transcrit par le promoteur EF-1α.

La première étape procédurale dans le cadre de cette expérience est donc le génotypage, qui nous permet de sélectionner que les souris transgéniques vGLUT2-Cre pour nos expériences successives.

1.5 Genotyping

Le génotypage est une analyse génétique moléculaire qui permet de vérifier la présence d'un transgène spécifique dans le génome d'un animal. Grâce à une PCR (polymerase chain reaction), il est possible de vérifier rapidement si un animal est transgénique ou non. Dans le cadre de cette étude, l'amplification est qualitative, ce qui permet de déterminer la présence ou l'absence du transgène Cre mais pas la nature homozygote ou hétérozygote de l'animal.

La procédure prévoit d'abord l'isolement de l'ADN des biopsies (dans notre cas, des doigts de souris) et ensuite l'amplification spécifique d'une portion de l'unité codante iCre, à l'aide de la PCR qualitative.

Chaque doigt de souris est traité pendant 20 min à 95°C (dans une chambre chauffée ThermoStat Plus, Eppendorf) avec un tampon de lyse constitué de 25 mM d'NaOH et 0.2 mM d'EDTA; ensuite, les échantillons sont traités avec une solution à 40 mM de Tris HCl (pH 5). L'ADN obtenu est ensuite amplifié par PCR. Les amorces utilisées pour la réaction sont diluées au 10 µM et ont les séquences suivantes :

- mICre F : 5'CCAGCTCAACATGCTGCACA 3';
- mICre R : 5' GCCACACCAGACACAGAGAT 3'.

Pour chaque échantillon, nous préparons un mélange contenant 2 µl ADN, 12.5 µl de Mix (une solution contenant la Taq ADN Polymerase, les dNTPs et le MgCl₂; PCR Master Mix, Promega), 1 µl de chaque amorce et 8.5 µl d'eau stérile.

Le thermocycler MasterCycler (Eppendorf) est programmé selon le protocole suivant :

- dénaturation à 95°C pendant 6 min;
- hybridation à 65°C pendant 1 min;
- amplification: 35 cycles à 72°C pendant 1 min;
- fin de la réaction à 4°C.

Chaque échantillon (auquel sont rajoutés 4 µl d'un marqueur (Bleu/Orange Loading Dye, 6X, Promega) est déposé pour la migration, effectuée avec un contrôle de charge pré-marqué pour vérifier le poids moléculaire (PCR Marker, Promega) sur un gel d'électrophorèse à 1% d'agarose (Amresco) qui contient l'agent intercalant GelRed (Interchim).

Après 30 min de migration, le gel est inséré dans une chambre à UV (Labolan). La détection d'une bande de 400 bp indique la présence du transgène Cre dans l'ADN. La méthode est rendue fiable par la présence d'un contrôle positif, un contrôle négatif et un blanc.

1.6. Optogénétique *in vitro*

1.6.1 Animaux et injection d'AAV

Pour ce type d'expérience nous avons utilisé des souris transgéniques Knock-in vGLUT2-Cre avec fond génétique C57/BL6 (n=5; poids: 15 g environ; Jackson Labs).

Cette expérience prévoit l'injection unilatérale d'un AAV2 exprimant la ChR2 dans le SumL. La procédure chirurgicale d'injection d'AAV est la même décrite dans le paragraphe 1.7 de ce chapitre.

Une trépanation est effectuée aux coordonnées: (AP) -2.2 mm du Bregma; (ML) +1.3 mm; (DV) -5.3 mm par rapport à la surface du crâne, avec un angle medio-latéral de 18°.

1.6.2 Electrophysiologie *in vitro*

Une anesthésie profonde est induite par l'injection i.p de pentobarbital sodique (150mg/kg), suite à laquelle la souris est décapitée. Une large ouverture crânienne est pratiquée et le cerveau est prélevé. Le cerveau isolé est immédiatement placé dans une solution refroidie à 4°C reproduisant les concentrations en espèces ioniques proches de celles du liquide céphalo-rachidien. Cette solution Ringer modifiée (sucrosée pour prévenir les chocs osmotiques, et au rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ faible afin de limiter l'activation des récepteurs NMDA) présente la composition suivante (en mM) : 85 NaCl, 26 NaHCO_3 , 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 0.5 CaCl_2 , 4 MgCl_2 , 25 glucose et 75 D-Sucrose (300 mOsm). Cette solution est oxygénée par bullage d'un mélange gazeux $\text{O}_2\text{-CO}_2$ (95:5) qui permet également d'ajuster le pH de la solution à 7.3 grâce au pouvoir tampon des ions carbonates. Dans la solution Ringer refroidie, la partie rostrale du cerveau, contenant les bulbes olfactifs et l'extrémité rostrale des lobes frontaux, est enlevée puis les 2 hémisphères sont séparés au moyen d'une lame de rasoir. Les 2 hémisphères sont délicatement posés sur un bloc d'agar (4%) puis leur partie rostrale est collée avec le bloc d'agar sur la plateforme mobile d'un vibratome (Leica VT1000S) au moyen de colle cyanoacrylate. Les 2 hémisphères sont alors sectionnés en tranches coronales d'une épaisseur de 300-350 μm . Dans la plus grande partie de l'hippocampe dorsal, l'organisation topographique des réseaux de connexions est dans un plan parallèle au plan coronal du cerveau. Ainsi, le plan de section préserve les principales projections excitatrices de l'hippocampe constituées par la voie perforante du cortex entorhinal et les fibres moussues. Les tranches sont ensuite prélevées de la cuve du vibratome et transférées dans une chambre à interface contenant une solution modifiée de Ringer oxygénée (en mM: 124 NaCl, 26

NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 glucose). L'enregistrement débute après 1h de réchauffement progressif des tranches jusqu'à température ambiante. Pendant l'expérience, une tranche est placée dans une chambre d'enregistrement alimentée en continu par perfusion (~2ml/min, 33°C) de solution Ringer standard oxygénée (en mM: 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 CaCl₂, 4 MgCl₂, 10 glucose). La tranche de cerveau est stabilisée au fond de la chambre par un dispositif en platine en forme de lyre constitué de fils de nylon. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des techniques d'enregistrements extracellulaires des potentiels de champs locaux (LFP, pour "local field potentials") et intracellulaires en patch-clamp sur cellule entière.

1.6.3 Enregistrements extracellulaires LFP

L'enregistrement des potentiels de champs locaux s'effectue au moyen de pipettes de verre borosilicate (diamètre externe 1.5 mm, diamètre interne 0.86 mm, Clark Instruments), étirée au moyen d'une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instruments, USA). Ces électrodes, remplies de la solution 1 M NaCl, ont une résistance de ~1- 3M Ohm. L'électrode d'enregistrement LFP est placée dans la couche moléculaire du GD, près de la couche granulaire. La photostimulation, qui est assurée par un ensemble de 3 micro Light Emitting Diodes (LED) bleues (longueur d'onde de 465 nm, dimension de 500 µm) avec une intensité variable (maximum 20 mW), est contrôlée par une interface National Instrument (durée de stimulation de 2 ms à 50 ms). Cette photostimulation est placée sous la lamelle où se trouve la tranche de cerveau, au niveau de la couche moléculaire du GD (l'emplacement des LEDs est guidé par un micromanipulateur sous contrôle du microscope). Une réponse synaptique de la voie perforante (en général la voie perforante latérale) est évoquée par stimulation électrique pré-synaptique au moyen d'une électrode bipolaire en tungstène. Celle-ci est placée dans la zone moléculaire du GD, à une distance de 100-200 µm du site d'enregistrement (**Figure 4**). Les stimulations (intensité de 50 à 100 µA, pour une durée de 100 µs) sont délivrées au moyen d'une unité isolée de stimulation (Stimulus Isolator A360, WPI). Les stimulations des fibres du Sum (photostimulation) et de la voie perforante (stimulation électrique) sont séparées de plus d'une seconde pour éviter toute interaction entre les deux réponses synaptiques. La réponse synaptique est quantifiée par la mesure de la pente initiale et par l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSP). La réponse synaptique extracellulaire ainsi obtenue est située au niveau d'un «puits» de potentiel («sink») pour la photostimulation des fibres du Sum, qui traduit un courant entrant dû à l'activation de toute une population de synapses excitatrices au niveau des dendrites des cellules granulaires. Pour

la stimulation électrique de la voie perforante, la réponse synaptique de cette voie correspond à une «source» de potentiel, le «puits» se situerait au niveau de la partie latérale de la couche moléculaire du GD. La réponse électrophysiologique est amplifiée (X 1000), filtrée (1Hz-1KHz, fréquence d'échantillonnage: 10 kHz) à l'aide un amplificateur différentiel (WPI, GB) puis numérisée par un convertisseur analogique/digital (National Instrument) pour l'acquisition sur un micro-ordinateur PC sous le logiciel Elphy.

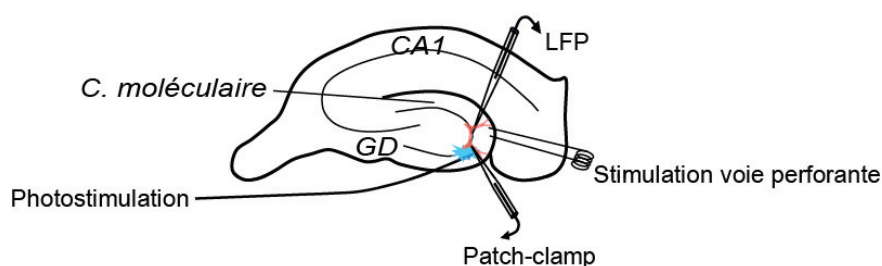


Figure 4. Description schématique de la validation in vitro de la photostimulation des fibres Sum.

Emplacement des électrodes d'enregistrement et des LED dans la tranche d'hippocampe. La pointe de l'électrode de LFP est située à côté de la couche des cellules granulaires dans la couche moléculaire.

1.6.4 Enregistrements intracellulaires en patch-clamp

Les enregistrements intracellulaires en patch-clamp ont été réalisés sur un autre poste d'enregistrement, qui comprend un microscope droit (Olympus BX50WI) avec des objectifs de grossissement 4X et 40X et une caméra CCD équipée d'un zoom 2-4 X. Un dispositif optique de contraste interférentiel (DIC) permet d'obtenir une bonne résolution des limites entre cellules. Cette technique de visualisation permet d'identifier anatomiquement les neurones (cellule granulaire ou interneurone inhibiteur) et de repérer soma et dendrites. Les neurones situés en surface de la tranche ayant souvent des dendrites sectionnées, les neurones enregistrés dans le cadre de ce travail sont situés en profondeur ($\geq 100 \mu\text{m}$). La visualisation des cellules en profondeur dans les tissus vivants est rendue possible par un dispositif de filtre infrarouge. Nous avons utilisé la technique de patch-clamp visualisée en configuration cellule entière qui permet d'enregistrer en courant ou potentiel imposé (signaux filtrés à 5 KHz, fréquence d'échantillonnage: 30 kHz). Les électrodes de patch-clamp sont obtenues à partir des mêmes filaments de verre que pour le LFP et présentent une résistance moyenne de $\sim 5 \text{ MOhm}$. Elles sont remplies de différentes solutions intracellulaires selon la configuration d'enregistrement. De la neurobiotine (0.1%) est ajoutée immédiatement avant utilisation dans la solution, laquelle est conservée à 4°C durant l'expérience. Le courant imposé consiste à enregistrer les variations du potentiel de membrane en réponse à la

stimulation d'une voie afférente (réponse synaptique du Sum ou de la voie perforante), ou en réponse à une injection intracellulaire de courant (dépolarisant ou hyperpolarisant). Pour ces expériences, la solution intracellulaire contient (en mM): 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 MgCl₂, 10 phosphocréatine, 2 Mg-ATP, 1 Na-GTP (300mOsm, pH 7.3). Le Mg-ATP et le Na-GTP sont ajoutés à la solution immédiatement avant utilisation. La réponse synaptique est enregistrée au potentiel de repos des cellules granulaires (~-80mV). Après l'obtention du niveau initial de la transmission synaptique du Sum et de la voie perforante, une stimulation d'intensité constante est appliquée toutes les 10 sec. L'injection intracellulaire de courant est effectuée par le convertisseur NI avec le programme d'acquisition de données et d'analyse Acquis/Elphy. Un créneau de courant répété tout au long de l'expérience permet de mesurer les éventuelles variations de la résistance et les modifications du "bridge balance", deux paramètres rendant compte de la qualité et de la stabilité du patch. L'amplitude du courant injecté et celle du potentiel membranaire sont mesurées simultanément grâce à l'amplificateur puis enregistrés au moyen du logiciel Elphy après passage du signal dans le convertisseur analogique/digital. Nos expériences ont essentiellement consisté à enregistrer en courant imposé les potentiels synaptiques et les potentiels d'action évoqués par des courants dépolarisants. Nous avons également testé, en voltage imposé, la contribution des récepteurs post-synaptiques AMPA (potentiel de maintien $V_h = -80$ mV) et NMDA ($V_h = +40$ mV en présence de NBQX, 5 μ M) dans la réponse synaptique, ainsi que les réponses inhibitrices GABA-AR.

1.6.5 Pharmacologie

Pour les expériences pharmacologiques, les substances suivantes ont été utilisées: Antagoniste des récepteurs AMPA NBQX (5 μ M, Tocris) et NMDA DAPV (50 μ M, Tocris); Antagoniste du Récepteur GABA A Gabazine (10 μ M, Tocris); Antagoniste du récepteur GABA B saclofen (40 μ M, Tocris), Agoniste des récepteurs cholinergiques carbachol (1 μ M, Sigma), Antagoniste du récepteur à l'adénosine de type A1 CPT (1 μ M, Tocris). Ces substances pharmacologiques ont été appliquées pendant 15 minutes, une concentration stable est obtenue à partir de 10 minutes.

Après enregistrement, les tranches sont fixées pendant 24h à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde (4% dans 0.1M de tampon phosphate). La neurobiotine est ensuite révélée directement grâce à un fluorophore (fluorescéine ou rhodamine liée à la streptavidine). Ce traitement permet d'identifier et localiser les neurones enregistrés en patch-clamp.

1.7. Optogénétique *in vivo*

Au cours de cette thèse, plusieurs manipulations d'optogénétique ont été réalisées, qui nous ont permis de mettre au point cette technique au laboratoire. En effet, au début nous avons réalisé des expériences d'injection d'un AAV2 dans le Sum médian, avec une fibre optique implantée dorsalement au Sum chez des souris transgéniques knock-in vGLUT2-Cre. Une électrode LFP était placée dans le dGD. Avec cette méthode nous n'avons pas obtenu une bonne transfection du SumL, donc ensuite nous avons réalisé l'injection unilatérale d'un AAV2 exprimant la ChR2 dans le SumL chez des souris transgéniques knock-in vGLUT2-Cre. L'implantation de la fibre optique était réalisée dans le dGD, avec un angle de 15° par rapport à l'électrode LFP. Même si nous avons obtenu une meilleure transfection des cellules du SumL, nous n'avons pas obtenu une bonne transfection des fibres du SumL dans le dGD. Nous avons ensuite commencé une collaboration avec le laboratoire de Monique Esclapez (chercheur à l'Institut de Neurosciences des Systèmes de Marseille). En effet, des expériences d'optogénétique *in vitro* étaient déjà en cours dans cette équipe et les résultats semblaient très prometteurs. Nous avons donc réalisé des expériences *in vivo* en collaboration entre les laboratoires de Marseille et de Lyon (procédure chirurgicale à Marseille, enregistrements polysomnographiques et stimulations optogénétiques à Lyon), et nous avons obtenu les premières résultats positifs fin 2015.

La procédure chirurgicale prévoit l'injection bilatérale d'un AAV5 exprimant la ChR2 ou la eNpHR3.0 dans le SumL et l'implantation d'une optrode dans le dGD chez des souris transgéniques knock-in vGLUT2-Cre. Les électrodes EEG et EMG sont implantées classiquement (**Figure 5**).

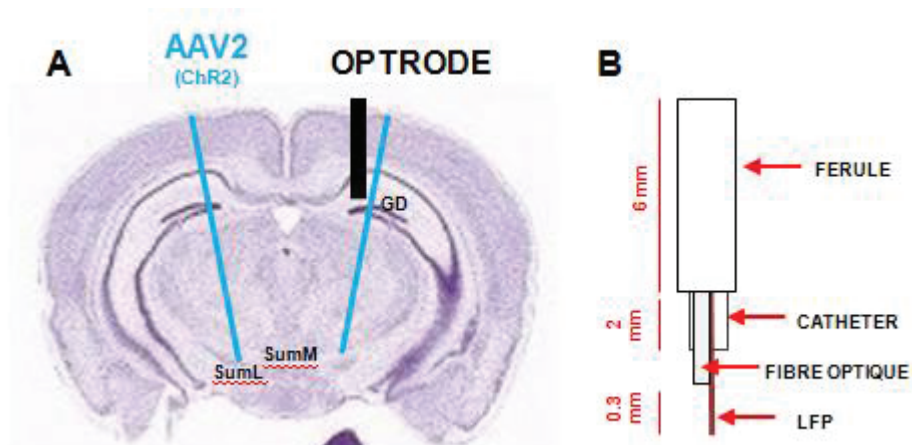


Figure 5. Optogénétique *in vivo*.

(A) Schéma de la procédure chirurgicale utilisée. L'AAV est injecté dans le SumL avec un angle ML de 11°. L'optrode est implantée dans le dGD.

Abréviations: GD: gyrus dentelé; SumL: noyau supramammillaire latéral; SumM: noyau supramammillaire médian.

(B) Schéma de l'optrode utilisée. Elle est constituée par une fêrulle et une fibre optique, insérées dans un cathéter avec une électrode LFP. L'ensemble a une longueur d'environ 1 cm. Quatre semaines après la chirurgie, la fêrulle est branchée au laser par un câble («patch cable») constitué par une fibre optique qui présente à une extrémité une fêrulle insérée dans un adaptateur («sleeve») et à l'autre extrémité le connecteur FC/PC relié au laser (voir paragraphe 1.7.4).

1.7.1 Animaux

Le protocole expérimental suivant a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (protocole DR-2015-04). Les expériences *in vivo* ont été menées sur 15 souris mâles adultes (25-30 g environ) transgéniques knock-in vGLUT2-Cre sur fond génétique FVB (Jackson Labs). A leur arrivée, les animaux sont placés en groupe dans de grandes cages avec eau et nourriture *ad libitum*. Durant 7 jours, les animaux sont habitués aux nouvelles conditions d'hébergement et à l'expérimentateur.

1.7.2 Procédure chirurgicale d'injection d'AAV

Lors de la chirurgie, l'animal est anesthésié par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine, un anesthésique (Virbac Santé Animale) et de xylazine, un myorelaxant (Bayer) à la dose de 100 mg/kg et 50 mg/kg, respectivement. Une infiltration de lidocaïne (Xylovet, Ceva Santé Animale) est réalisée sur la zone d'incision, son effet analgésique dure environ 2 h. Tout au long de la chirurgie, la profondeur de l'anesthésie est surveillée en vérifiant l'abolition des réflexes pupillaires et du retrait au pincement de la patte. Si une complémentation d'anesthésique est nécessaire, le protocole suivant est utilisé: 50 mg/kg de kétamine seule pour les injections paires (2ème, 4ème, ...), et un mélange de

kétamine/xylazine (50 mg/kg et 20 mg/kg respectivement) pour les injections impaires (3ème, 5ème, ...).

Une fois anesthésié, la peau du crane est rasée puis l'animal est placé dans un appareil de contention stéréotaxique (David Kopf Instruments): la tête est maintenue fixe à l'aide de barres d'oreilles et d'une pièce de maintien des incisives.

Le dessus du crâne est nettoyé avec une solution iodée (Betadine). A ce stade, une application de pommade ophtalmique est effectuée pour prévenir le dessèchement des yeux. La peau du crâne est incisée sur toute la longueur du crâne à l'aide d'un scalpel, réclinée et maintenue sur les bords latéraux par des pinces hémostatiques. L'os du crâne est nettoyé à l'aide d'un tampon imbibé de 30% de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La tête de l'animal est précisément mise à l'horizontale en se servant des coordonnées stéréotaxiques du Bregma et du Lambda. La tête est considérée «à plat» quand la mesure dorso-ventral au niveau du Bregma est égale à celle du Lambda.

Deux trépanations sont effectuées aux coordonnées: (AP) -2.7 mm du Bregma; (ML) +/- 1.25 mm; (DV) -4.8 mm par rapport à la surface du cerveau, avec un angle medio-latéral de 11°.

Pour l'injection de l'AAV nous avons utilisé une seringue Hamilton de 5 µl insérée dans le pousse-seringue programmable (UMP3 avec SYS-Micro4 Controller, WPI) et fixée directement sur l'appareil stéréotaxique. L'aiguille d'Hamilton (diamètre de 0.2 mm) est descendue directement dans le cerveau, sans avoir à percer la dure-mère. Une fois l'aiguille en place dans le cerveau, nous débutons immédiatement l'éjection de la solution virale. Le volume de solution virale injectée est d'1 µl par coté, à une vitesse de 200 nl/min. Une fois le processus terminé, l'aiguille est laissée en place pendant 2 min supplémentaires et puis lentement remontée.

1.7.3 Procédure chirurgicale d'implantation des fibres optiques

Les fibres optiques sont utilisées pour fournir de la lumière aux régions spécifiques d'intérêt dans le cerveau. Des fibres optiques de petit diamètre (0.2 mm) minimisent les dommages des tissus et peuvent être couplés de manière efficace à des sources de lumière laser. Une caractéristique importante de la fibre optique est son ouverture numérique (NA), c'est-à-dire l'angle du cône lumineux produit par la fibre. Plus le NA est grand, plus le cône de lumière est ample et peut donc illuminer une zone plus large, avec en revanche une intensité lumineuse plus faible. Par ailleurs, la fibre peut être coupée à la longueur appropriée pour cibler une région spécifique du cerveau et peut soit être fixée directement sur le crâne soit être insérée dans le cerveau à travers un guide canule. Les fibres peuvent être placés de manière

bilatérale ou utilisées dans d'autres configurations pour cibler de grandes régions du cerveau (Warden et al., 2014).

Nous avons utilisé dans ce cas un système de férule construit à la main: par ce biais, les fibres optiques sont directement insérées dans le cerveau. Une extrémité de la fibre optique (0.2 mm de diamètre, 0.39 NA, Thorlabs) est dénudée avec un dénudeur de fibres (Thorlabs) et coupée à la bonne longueur à l'aide d'un coupeur à forme de stylo avec une pointe de diamant («fiber optic scribe», Thorlabs); la fibre est ensuite insérée dans la férule (1.25 mm de diamètre, Thorlabs). L'ensemble fibre+férule est ensuite solidarisé avec de la colle Epoxy (Bostik).

La férule est puis insérée dans un cathéter (2 mm de longueur, diamètre interne 0.3 mm, diamètre externe 0.6 mm), dans lequel est aussi insérée l'électrode LFP précédemment fabriquée.

L'ensemble férule+LFP+cathéter est ensuite solidarisé avec de la colle photopolymérisable (Adper Scotchbond, 3M). L'optrode obtenue a une longueur d'environ 2 mm et présente une distance entre la pointe de la fibre et celle de l'électrode de 300 μm (**Figure 5B**).

L'optrode est implantée dans le dGD aux coordonnées suivantes: (AP) -2 mm du Bregma; (ML) -1.1 mm; (DV) -1.7 mm par rapport à la surface du cerveau. L'optrode est ensuite solidarisée au crâne par de la résine dentaire (Super-Bond c&B, Sun Medical co. Ltd).

1.7.4 Récupération post-opératoire

Immédiatement après la chirurgie, les animaux sont placés dans des cages en plexiglas translucide individuel où ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Pendant 3 semaines les animaux restent en quarantaine dans des armoires ventilées pour éviter la potentielle transmission de l'AAV à d'autres organismes avant de débiter les enregistrements polysomnographiques et les stimulations lumineuses. De plus, cette durée permet d'obtenir une excellente récupération post-chirurgicale, et une expression importante des transgènes.

Au terme de la période de quarantaine, les animaux sont branchés aux câbles d'enregistrement et aux lasers pour les stimulations lumineuses.

La férule est branchée à un câble appelé «patch cable», qui est constitué par une fibre optique qui présente à une extrémité une férule (1.25 mm de diamètre; Thorlabs) insérée dans un adaptateur («sleeve», 1.5 mm de diamètre; Thorlabs) et à l'autre extrémité le connecteur FC/PC relié au laser.

1.7.5 Stimulations lumineuses

Les stimulations lumineuses sont envoyées aux animaux manuellement à l'aide du logiciel Spike 2. Un signal TTL (Transistor-Transistor Logic) est envoyé au laser qui s'allume. La voie TTL est visible sur l'écran de l'ordinateur utilisé pour l'acquisition des enregistrements polysomnographiques.

La puissance à la sortie des fibres optiques est mesurée avant l'implantation des fibres avec un capteur spécifique connecté à un compteur de puissance (Thorlabs).

ChR2

Les stimulations sont effectuées avec des lasers bleus (Laserglow). La puissance à la sortie de la fibre optique est d'environ 10 mW. Les stimulations sont effectuées pendant 4 jours avec le protocole suivant (ChR2: n=4; témoins (injectés avec l'AAV contrôle): n=4):

- J1: 10 msec 20 Hz 10sec pendant le SP pendant 4h;
- J2: 10 msec 20 Hz 10sec pendant le SL pendant 4h;
- J3: 10 msec 20 Hz 10sec pendant l'EV pendant 4h;
- J4: 10 msec 20 Hz pendant 15 min. 90 min après le début de la stimulation les souris sont euthanasiées.

eNpHR3.0

Les stimulations sont effectuées avec des lasers verts (Laserglow). La puissance à la sortie de la fibre optique est d'environ 10 mW. Les stimulations sont effectuées pendant 4 jours avec le protocole suivant (eNpHR3.0: n=4; témoins (injectés avec l'AAV contrôle): n=3):

- J1: en continu 10 sec pendant le SP pendant 4h;
- J2: en continu 10 sec pendant le SL pendant 4h;
- J3: en continu 10 sec pendant l'EV pendant 4h.
- J4: en continu pendant 10 sec+10 sec off pendant 15 min. 90 min après le début de la stimulation les souris sont euthanasiées.

2. La polysomnographie

2.1 Principe et électrodes

Le principe de la polysomnographie est d'enregistrer les paramètres nécessaires pour déterminer les états de vigilance; ceux que nous utilisons sont l'électroencéphalographie (EEG), l'électromyographie (EMG), et l'enregistrement des potentiels de champs locaux dans le GD (LFP, **Figure 6**).

Le signal électrique constituant l'EEG résulte d'une sommation des potentiels d'action post-synaptique synchrones issus de nombreux neurones corticaux proches des électrodes. Ces phénomènes de synchronisation déterminent l'amplitude et le rythme de l'EEG et dépendent de certaines populations de neurones présentant une similitude architectonique et fonctionnelle. L'amplitude et la fréquence de l'EEG ont des caractéristiques propres à chacun des états de vigilance de l'animal.

Les électrodes EEG sont constituées d'une petite vis d'1 mm de diamètre (Plastics One) soudée à un fil électrique multibrin (Medwire).

Les électrodes LFP sont constituées de 2 fils en tungstène de 45 μm de diamètre (California Fire Wire Company), torsadés et collés ensemble pour former une structure rigide et solide, avec les 2 extrémités des fils séparées de 100 μm l'une de l'autre. Si les EEG sont localisées à la surface du cerveau, et donc enregistrent l'état global de l'activité neuronale dans la région au-dessus de laquelle elles sont implantées, les électrodes LFP sont des électrodes profondes qui traversent la dure-mère et sont descendues dans une région spécifique du cerveau, pour enregistrer son activité locale. Les enregistrements EEG et LFP sont différentiels unipolaires, et la mesure obtenue est le rapport entre le potentiel électrique enregistré par l'électrode avec celui enregistré par l'électrode de référence. Dans cette étude, l'électrode de référence est placée au niveau du cervelet, où aucune modification des ondes n'a été constatée au cours des états de vigilance.

L'EMG permet de mesurer l'activité musculaire tonique et les événements phasiques (secousses). Deux électrodes musculaires sont classiquement placées entre deux plans musculaires au niveau de la nuque. Les EMG sont constituées d'un fil multibrin (Medwire) avec à son extrémité une petite boule d'étain. Pour l'EMG la mesure est bipolaire et

différentielle et correspond donc à la différence de potentiel enregistrée entre les deux électrodes.

Les fils des EEG, LFP et EMG sont soudées à une fiche électrique (Plastics One) s'insérant dans un microconnecteur (Plastics One), lui-même solidarisé au crâne.

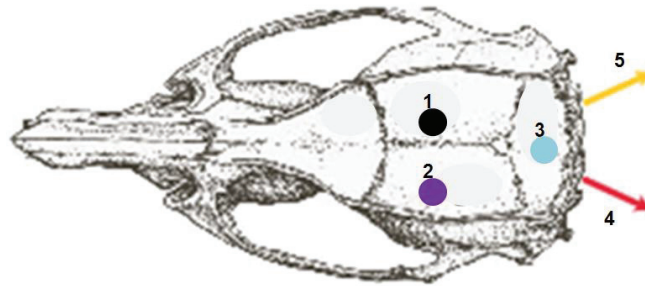


Figure 6. Schéma représentant la position des électrodes EEG, LFP et EMG sur le crâne de la souris.

1=LFP ; 2=EEG pariétal ; 3=référence ; 4=EMG de gauche ; 5=EMG de droite.

2.2 Procédure chirurgicale d'implantation des électrodes

L'implantation des électrodes d'enregistrement a lieu toute suite après l'injection de l'AAV,. Des trépanations sont réalisées pour mettre en place les électrodes EEG et LFP aux coordonnées suivantes :

-EEG pariétal: (AP) -2 mm du Bregma; (ML) +1.5 mm;

-EEG référence: (AP) -6 mm du Bregma;

-LFP: (AP) -2 mm du Bregma; (ML) -1.1 mm; (DV) -1.7 mm par rapport à la surface du cerveau.

Avant de descendre l'électrode LFP, il est nécessaire d'enlever la dure-mère avec une aiguille.

Les électrodes sont ensuite solidarisées par de la résine dentaire (Super-Bond c&B, Sun Medical co. Ltd). Les EMG sont glissées entre deux plans musculaires de part et d'autre de la nuque. L'ensemble est fixé au crâne du rat par du ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kuzler). La plaie est suturée à l'avant et à l'arrière de la prothèse. Une solution iodée est appliquée sur le pourtour de la prothèse afin de désinfecter la plaie.

2.3 Acquisition des enregistrements polysomnographiques

Les souris sont placées pendant 4 jours dans un caisson d'enregistrement afin de les habituer aux conditions d'enregistrement. Le caisson d'enregistrement est ventilé, isolé phoniquement et électriquement. Il est éclairé selon un cycle de 12 heures (de 8 h à 20 h) et la température y est régulée ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), en phase avec les conditions de stabulation. Les animaux sont habitués au port du câble qui les relie au dispositif d'enregistrement. Le câble d'enregistrement relie le micro-connecteur implanté sur la tête de l'animal à un collecteur, ce qui permet d'assurer la continuité des signaux enregistrés sans entraver les mouvements de la souris.

A l'issue de cette habitude, les enregistrements contrôles débutent, pour une durée de 48 h. L'acquisition des données polysomnographiques est entièrement informatisée. Les signaux EEG et EMG sont amplifiés (Reega Minihuit Tr, Alvar Electronic), numérisés par un convertisseur CED 1401 (fréquence d'échantillonnage 1041.7 Hz; Cambridge Electronic Design) et enregistrés avec le logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design). Les canaux EEG et LFP sont mesurés en unipolaire, par un différentiel entre chaque électrode EEG et l'électrode de référence localisée au-dessus du cervelet. Le signal EMG est calculé en mesurant le différentiel entre deux électrodes EMG (signaux bipolaires).

2.4 Analyse des enregistrements polysomnographiques

Les enregistrements filtrés et centrés (filtre à 50 Hz, composante continue supprimée), sont soumis à une analyse visuelle semi-automatique et séquentielle du tracé (par plages d'analyse de 5 secondes) à l'aide du logiciel SlipAnalysis développé au laboratoire par PA Libourel et J Carponcy sous Matlab. L'hypnogramme représentant l'enchaînement des différents états de vigilance en fonction du temps est construit en attribuant un des états de vigilance (EV, SL et SP) à chaque plage d'analyse en fonction des critères décrits dans la première page de l'introduction et brièvement résumés ci-après.

L'EV se caractérise par un EEG de faible amplitude et désynchronisé. Des ondes de haute fréquence (40 Hz) sont observées ainsi que des ondes thêta (6-12 Hz). L'EMG varie selon

l'activité motrice de l'animal. On observe une activité musculaire tonique ample avec de nombreux événements phasiques au cours de l'EV actif et un tonus musculaire plus faible avec de rares secousses pendant l'EV calme.

L'SL présente l'EEG de plus haut voltage et des oscillations lentes (ondes delta: 0,5-5 Hz et fuseaux: 12-14 Hz). Il est dit «synchronisé». L'activité musculaire est faible.

L'SP se caractérise par un EEG similaire à celui de l'EV, désynchronisé, rapide et de faible amplitude. Il présente toutefois une périodicité plus marquée autour de 6-12 Hz (rythme thêta généré par l'hippocampe). L'EMG montre l'absence de tonus musculaire (atonie).

L'analyse informatique de l'hypnogramme ainsi obtenu permet ensuite de calculer automatiquement la durée totale de chacun des 3 états de vigilance, leurs proportions relatives ainsi que le nombre et la durée moyenne des épisodes. Il permet également de sélectionner des épisodes des 3 états de vigilance sans artéfacts afin d'évaluer les différences dans les spectres de fréquence.

2.5 Analyse spectrale

Afin de déterminer les caractéristiques spectrales de l'LFP et l'EEG avant et pendant la stimulation optogénétique durant les différents états de vigilance, nous avons utilisé un protocole permettant une analyse fine du signal (Parmentier et al., 2002; Beuckmann et al., 2003). Cette étude du signal utilise une transformée rapide de Fourier (méthode mathématique fondée sur la démonstration émise par le mathématicien français Joseph Fourier, selon laquelle un son complexe peut se «réduire» à une somme de composantes sinusoïdales). Cette technique permet ainsi de décomposer une fonction du temps en un spectre de fréquence. L'analyse spectrale a été réalisée à l'aide du logiciel SlipAnalysis développé au laboratoire par PA Libourel et J Carponcy sous Matlab.

Nous avons donc obtenu un spectre des fréquences comprises entre 0 et 40 Hz et entre 60 et 100 Hz. Les spectres de fréquences sont ensuite regroupés en gammes de fréquences utilisés couramment, en réalisant la somme des puissances de tous les rangs compris dans chaque gamme. A savoir: delta 1-4 Hz ; thêta 6-12 Hz; sigma 12-14 Hz, beta 15-30 Hz, gamma 30-100 Hz. Pour les souris Chr2 et leur respectifs témoins, les bandes spectrales à 20 Hz et ses harmoniques ont été exclues de l'analyse à cause de la présence d'artefacts (voir paragraphe

3.1.2 des Résultats). L'analyse est synchronisée par rapport au déclenchement des stimulations optogénétiques (fenêtre glissante=1 sec). De cette manière la moyenne des spectres avant et pendant toutes les stimulations de l'enregistrement est calculée. Par exemple, dans le cas d'une stimulation optogénétique de 10 sec à 20 Hz, nous calculons le spectre moyen pendant les 10 sec de stimulation et le spectre moyen pendant les 10 sec avant la stimulation.

4. Perfusion et préparation histologique

4.1 Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde

La perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PFA) permet de conserver, par fixation chimique, le tissu à étudier dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, tout en le rendant imputrescible. Le PFA est un fixateur réticulant qui entraîne la formation de ponts méthylène (CH_2) entre les protéines et permet ainsi de préserver la structure du tissu, les protéines et les ARN.

La perfusion du PFA se fait par le réseau vasculaire, ce qui permet une bonne diffusion du fixateur dans le tissu d'intérêt. Avant la perfusion du PFA il est possible de faire circuler une solution physiologique dans le système vasculaire afin de nettoyer les tissus et d'éliminer les peroxydases endogènes contenues dans les globules rouges (important si la révélation immunohistochimique se fait avec des peroxydases).

Une anesthésie profonde est induite par injection i.p de pentobarbital sodique (150 mg/kg). Après ouverture du thorax, une aiguille de perfusion est introduite dans le ventricule gauche tandis que l'oreillette droite est incisée pour laisser s'écouler le sang. L'animal est perfusé successivement avec 50 ml de Ringer-Lactate hépariné, puis avec 150 ml d'une solution de fixation composée de PFA à 4% dans 0,1 M de tampon phosphate (PB) à pH 7,4. Le cerveau est prélevé puis plongé dans la solution de PFA pour une surfixation de ~24h à 4°C.

4.2 Réalisation et conservation des coupes histologiques

Le liquide de fixation est ensuite remplacé par une solution de PB stérile 0.1 M contenant 30% de Sucrose et 1g/l d'azide: cette étape permet de saturer le tissu et donc d'éviter l'éclatement des cellules lors de l'étape de congélation du tissu. Ensuite, le cerveau est rapidement plongé dans un récipient contenant de l'isopentane à environ -40°C placé dans de la carboglace. Le cerveau est ensuite coupée à -20°C à l'aide d'un cryostat (HM 550, Microm) en sections frontales sériées de 30 µm d'épaisseur, depuis le cortex frontal jusqu'à l'extrémité caudale du cervelet. Les coupes flottantes sont recueillies dans des puits de boîtes de culture remplis d'une solution cryoprotectrice dépourvue de RNase (DEPC 0,05%, Glycérol 20%, Ethylène Glycol 30% dans du tampon K_2HPO_4 / KH_2PO_4 50 mM pH 7,4).

4.3 Immunohistochimie

4.3.1 Principe de l'utilisation de la protéine FOS comme marqueur fonctionnel

L'expression de la protéine FOS reflète les variations importantes de l'activité des neurones en réponse à une stimulation physiologique donnée (Sagar et al., 1988). Quand une cellule est stimulée, des potentiels d'action se déclenchent et les récepteurs membranaires s'activent. Ces événements déterminent l'activation de seconds messagers intracellulaires (la voie des MAP kinases ou l'entrée des ions calcium dans la cellule) qui entraînent l'expression de facteurs de transcription aussi appelés gènes d'activation précoce (IEGs pour Immediate-early genes) dont FOS. L'expression de ces IEG reflète de façon indirecte l'activation cellulaire. La stimulation de la cellule entraîne la surexpression de L'ARNm de FOS dont le pic est observé 30 min après celle-ci alors que le pic d'expression de la protéine FOS est observé entre 90 et 120 min après le stimulus (Kovacs, 2008). La visualisation de la protéine FOS par immunohistochimie chez un animal sacrifié dans les heures qui suivent un stimulus permet donc de tracer à l'échelle cellulaire les réseaux neuronaux recrutés par cette stimulation.

Plusieurs travaux, dont ceux du laboratoire (Maloney et al., 1999, 2000; Verret et al., 2005, 2006) valident l'utilisation de la protéine FOS comme marqueur des neurones activés pendant le SP.

4.3.2 Principe de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique qui permet de localiser un antigène cible dans un tissu. Cet antigène peut être une molécule endogène (neurotransmetteur, récepteur, facteur de transcription, enzyme de synthèse...) ou exogène (neurobiotine, traceurs anatomiques).

Le tissu cible est incubé avec un anticorps primaire (monoclonal, dirigé contre un seul épitope de l'antigène ou polyclonal, reconnaissant plusieurs épitopes de l'antigène) qui se fixe spécifiquement sur l'antigène d'intérêt; puis l'anticorps est révélé par un système de marquage utilisant des composés (fluorochromes, éléments radioactifs ou enzymes) détectables en microscopie (optique ou électronique).

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé une réaction enzymatique d'oxydo-réduction qui induit la formation d'un précipité coloré repérable en microscopie optique. L'immunohistochimie est dite "directe" si le marqueur est directement fixé sur l'anticorps primaire. Nous avons cependant utilisé une technique "indirecte" qui met en jeu un anticorps secondaire biotinylé et une réaction d'affinité entre deux composés protéiques, l'avidine et la biotine (**Figure 7**).

Cette technique permet d'amplifier l'intensité du signal immunologique puisque plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur les anticorps primaires contre lesquels ils sont dirigés, et que la réaction d'affinité aboutit à la formation d'un complexe enzymatique (ABC) qui s'agglomère autour de l'échafaudage d'anticorps. C'est ce dernier qui est révélé en réalisant une réaction d'oxydo-réduction entre la peroxydase de raifort (HRP, "Horse Radish Peroxydase") contenue dans le complexe ABC et son substrat, l' H_2O_2 , ajouté au moment de la réaction en présence de 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB). Elle transforme son substrat (l'eau oxygénée) en eau (H_2O) et en protons (H^+) qui vont alors oxyder la molécule de révélation, la 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB), et la transformer en un précipité marron insoluble autour de l'échafaudage immunoprotéique. Il est possible d'ajouter du sulfate de Nickel lors de la révélation, le précipité coloré formé est alors noir (technique DAB-Ni).

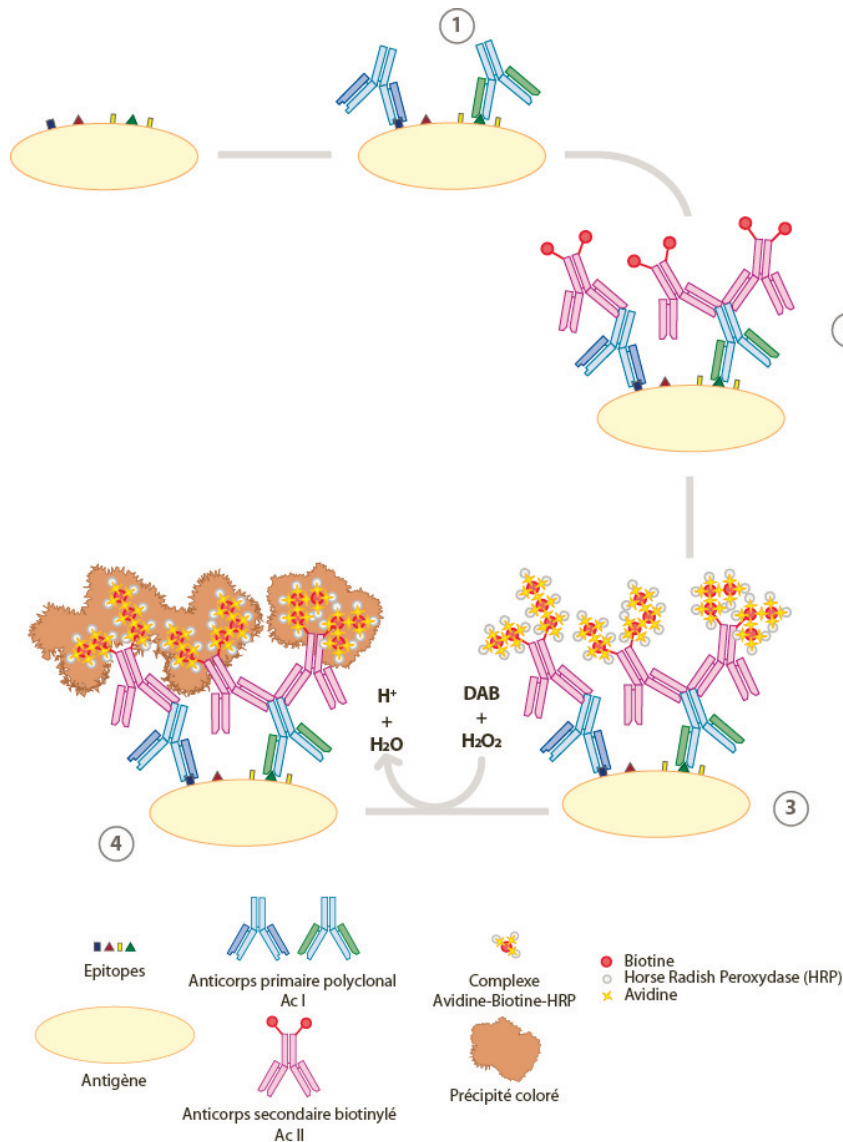


Figure 7. Principe de la détection immunohistochimique d'un antigène.

Les anticorps primaires (Immunoglobulines G, IgG, faits chez l'espèce x) reconnaissent et fixent l'antigène (1). Ils sont reconnus par les anticorps secondaires biotinylés (faits chez l'espèce y et dirigés contre les IgG de l'espèce x) (2). Le complexe ABC (avidine/biotine/HRP) se lie aux molécules de biotine des anticorps secondaires (3). Au contact du peroxyde d'hydrogène, la peroxydase induit la formation d'un précipité de DAB (4).

4.3.3 Protocole détaillé d'immunohistochimie

Les coupes flottantes sont sorties du milieu de cryoprotection et rincées 3 fois 10 minutes dans du PB 10 mM (pH 7,4) additionné de NaCl à 0,9% et de Triton 100X à 0,3% (PBST). Les sections histologiques sont soumises à des bains d'incubation successifs sous agitation avec le protocole suivant :

- incubation pendant 1h30 à température ambiante dans une solution de PBST contenant 0.3% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette étape élimine les peroxydases des globules rouges résiduels dans le tissu;
- incubation pendant 3 nuits à 4°C dans une solution de PBST contenant l'anticorps primaire. Nous avons utilisé l'anticorps pour c-Fos (Anti-c-Fos (Ab-5) Rabbit pAb, Calbiochem, dilution 1:20000) et celui pour EYFP (dilution 1:10000);
- 3 rinçages de 10 minutes dans du PBST et incubation pendant 2 h à température ambiante dans une solution de PBST contenant l'anticorps secondaire biotinylé dilué 1:1000 (Vector Laboratories).
- 3 rinçages de 10 minutes dans du PBST et incubation pendant 1h30 à température ambiante dans une solution de PBST contenant le complexe Avidine-Biotine-Horse Radish Peroxydase (1:1000; Elite kit, Vector Laboratories).
- 3 rinçages de 30 minutes dans du PBST et incubation dans une solution de Tris-HCl 0,05 M à pH 7,6 contenant 0,025% de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich), 0,6% de sulfate de Nickel et 0,003% de H₂O₂. La réaction est contrôlée en permanence sous le microscope et arrêtée lorsque le rapport marquage spécifique/ bruit de fond est optimal (10-20 min).
- Pour arrêter la réaction, les coupes sont rincées sous agitation 3 fois 10 minutes dans du PBST contenant 0.1% sodium azide (PBST-az, Sigma Aldrich) puis montées sur des lames histologiques de verre gélatinées (1% de gélatine et 0,1% d'alun de chrome dans de l'eau distillée chauffée). Après séchage, elles sont directement montées sous lamelles avec de la colle Depex (VWR).

4.3.4 Analyse des résultats histologiques

Les coupes sélectionnées sont analysées à l'aide d'un microscope Axioscope (Zeiss) équipé d'une plateforme motorisée pour les axes X–Y-et une caméra vidéo connectée à un système d'analyse d'image (Mercator; ExploraNova). Les contours des coupes et des structures sont dessinés à faible grossissement (x2,5). Puis, les neurones immunoréactifs sont pointés à plus fort grossissement (x10 ou x20). Le logiciel permet un comptage semi-automatique des neurones marqués lorsque la protéine révélée est nucléaire. Ceci permet une analyse objective des puisque le seuil de détection, la taille et la forme des neurones est fixe durant toute l'exploration d'une coupe par le programme et entre les différents animaux. Les artéfacts sont ensuite éliminés manuellement. Les cellules immunoréactives à FOS ont été quantifiées

jusqu'à aujourd'hui sur 3 animaux ChR2 et 1 contrôle , vu que les expériences sont encore en cours.

Pour chaque animal nous avons analysé unilatéralement deux coupes séparées de 150 μm au niveau du dGD.

Le nombre de neurones FOS+, quantifié est exporté en utilisant Mercator (ExploraNova).

5. Analyses statistiques

L'analyse statistique de l'ensemble des données de cette thèse a été réalisée à l'aide du logiciel StatView. Nous avons utilisé des tests non paramétriques: Mann Whitney pour échantillons non appariés.

Résultats

1. Vérification et validation de l'injection de l'AAV5 dans le Sum

L'observation de la fluorescence endogène des coupes de cerveau nous indique que le site d'injection de l'AAV5 est très étendu et inclue le Sum et l'ensemble des structures voisines (**Figure 8A**). Un grand nombre de fibres fluorescentes fortement marquées sont visibles dans le GD. IL n'est pas nécessaire de réaliser l'immunohistochimie de la protéine EYFP pour les visualiser (**Figure 8B**). Ces résultats indiquent que la transfection est importante et efficace.

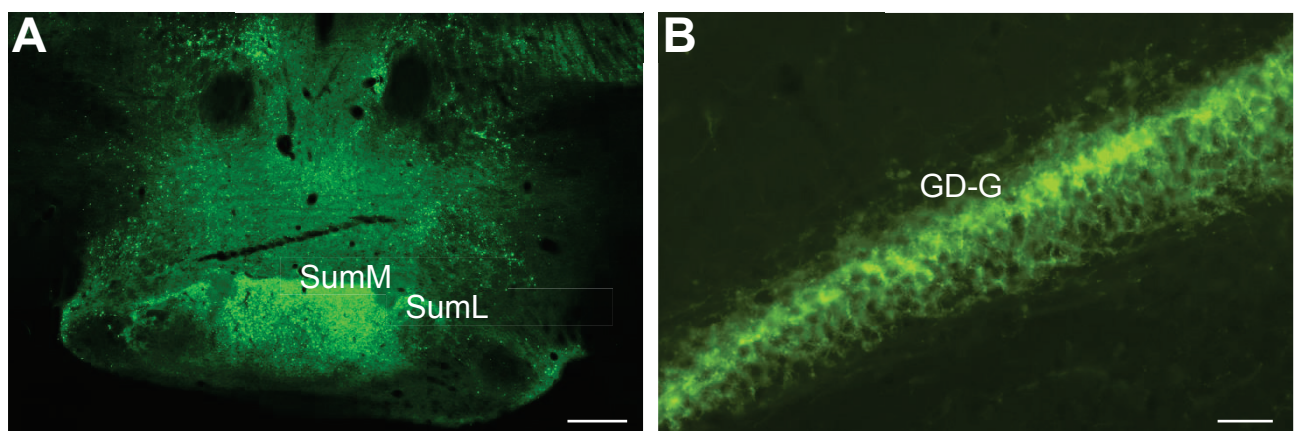


Figure 8. Exemple d'un site d'injection de l'AAV5-ChR2-EYFP dans le Sum et les structures adjacentes.

- (A) L'EYFP est exprimé par un très grand nombre de neurones bilatéralement au niveau du Sum médian (SumM) et latéral (SumL) et des structures adjacentes.
- (B) Dans le GD, de nombreuses fibres expriment fortement l'EYFP. Abréviations: GD-G: couche granulaire du GD.

Echelle: 500µm en (A), 50 µm en (B).

2. Optogénétique *in vitro*

L'enregistrement en LFP du GD pendant la stimulation optogénétique des fibres du Sum montre une réponse synaptique de faible amplitude (<0.1 mV). Les antagonistes glutamatergiques bloquent presque toute cette réponse synaptique qui est supprimée ensuite par l'antagoniste GABAergique (**Figure 9A**). La réponse synaptique du Sum correspond à un «puits» de potentiel, contrairement aux réponses de la voie perforante (données non montrées), suggérant que les synapses sont localisées à proximité de la couche des cellules granulaires. L'enregistrement en patch clamp pendant la stimulation optogénétique des fibres du Sum montre une réponse à la fois glutamatergique et GABAergique. Ces deux réponses commencent au même temps mais ont des cinétiques différentes: la réponse GABAergique est plus lente de celle glutamatergique (**Figure 9B**).

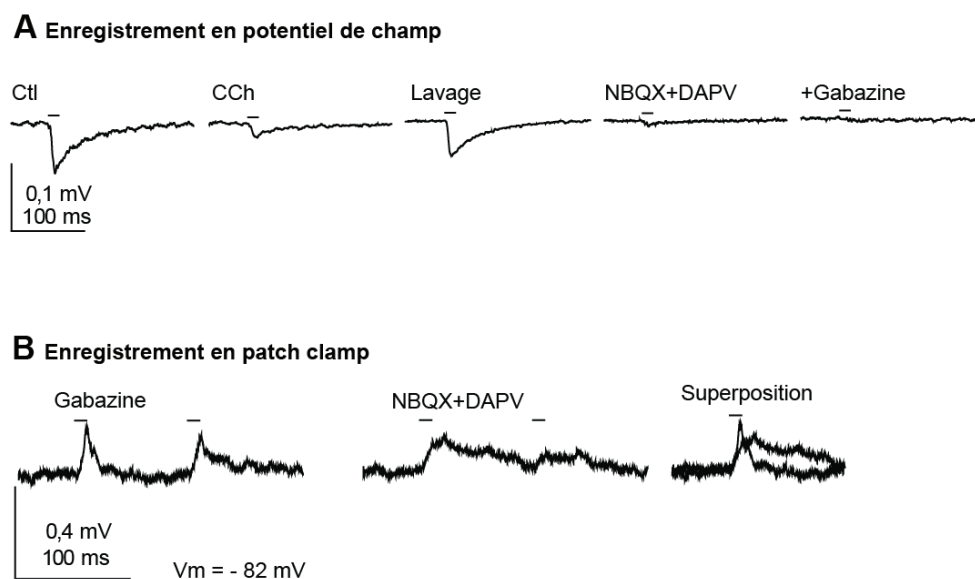


Figure 9. Validation électrophysiologique de la photostimulation des afférences venant du Sum.

- (A) Enregistrement de la réponse synaptique évoquée par la photostimulation des fibres du Sum. La réponse LFP est enregistrée en Ringer (Ctl, contrôle), en présence de carbachol (CCH, 1 μ M) agoniste des récepteurs cholinergiques, puis en présence des antagonistes des récepteurs glutamatergiques NBQX (5 μ M) et DAPV (50 μ M) et enfin, en présence de l'antagoniste GABA-A Gabazine (10 μ M). L'électrode de LFP est située dans la couche moléculaire à proximité de la couche des cellules granulaires.
- (B) Enregistrement en patch-clamp, configuration courant imposé ($V_m = -82$ mV, potentiel de repos de la cellule granulaire anatomiquement identifiée), de la réponse synaptique du Sum. Pour mieux identifier les composantes glutamatergiques et gabaergiques de la réponse synaptique les traces moyennées ont été soustraites: à gauche les réponses synaptiques glutamatergiques (Gabazine; obtenue après soustraction des traces enregistrées en Gabazine avec les traces contrôles) au milieu la réponse synaptique GABA (NBQX+DAPV; obtenue après soustraction des traces enregistrées en DAPV et NBQX avec les traces contrôles) et à droite la superposition des deux.

contrôles). Noter que la réponse synaptique GABAergique est dépolarisante, et prolongée par rapport par rapport à la réponse glutamatergique. A droite, superposition des réponses synaptiques glutamatergiques et gabaergiques indiquant le même délai des deux composantes synaptiques photostimulées.

3. Optogénétique *in vivo*

3.1 ChR2

3.1.1 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur l'architecture des états de vigilance

La stimulation optogénétique au cours de l'EV et du SL (20 Hz 10 sec, avec des pulses de 10 msec durant 4h pendant chaque état de vigilance) provoque des changements comportementaux. En effet, les stimulations au cours de l'EV provoquent une augmentation de l'activité locomotrice (**Figure 10A**), alors que les stimulations au cours du SL induisent de l'EV (**Figure 10B**). En revanche, les stimulations au cours du SP n'induisent pas de changement d'état de vigilance chez les souris ChR2 (**Figure 10C**). Aucun éveil n'est obtenu chez les souris témoins quel que soit l'état de vigilance.

Chez les témoins (n=4) il n'y a pas de différences significatives sur les quantités des états de vigilance entre les 4 h de stimulation optogénétique et les enregistrements contrôles réalisés sur les mêmes animaux.

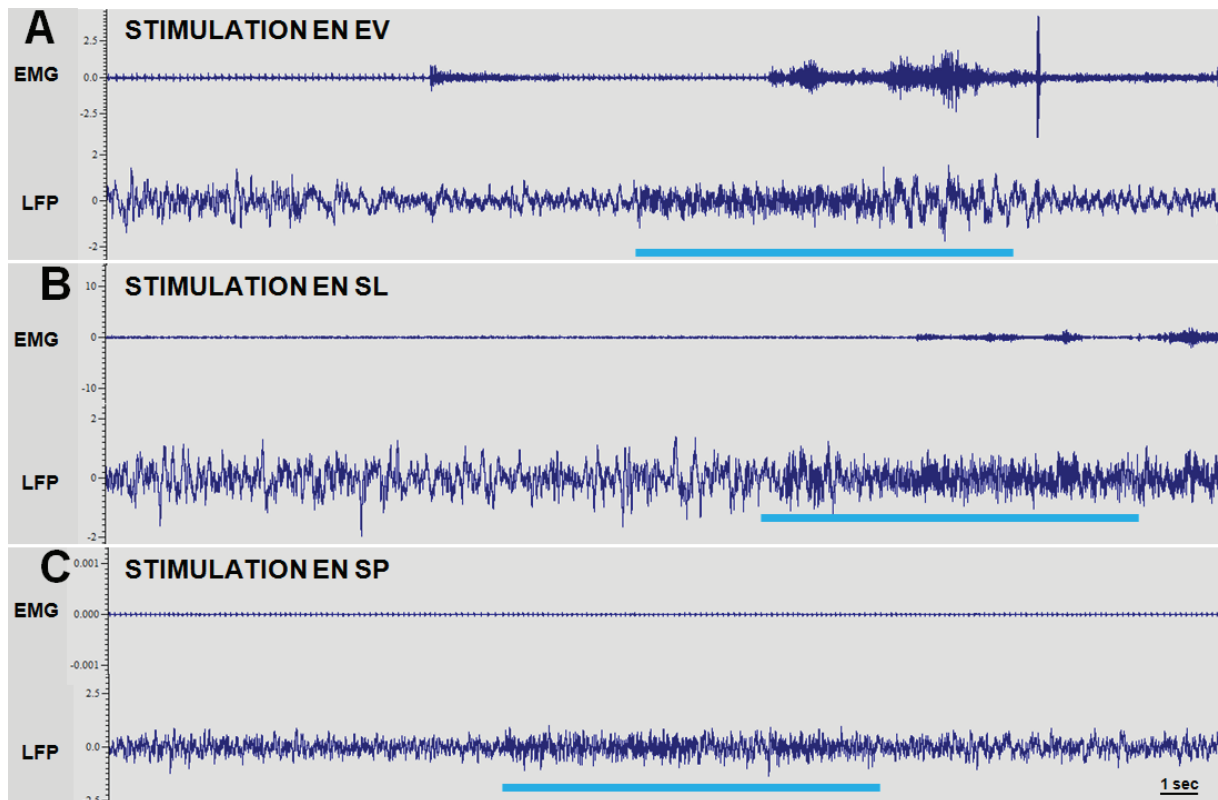


Figure 10. Exemples d'enregistrements bruts chez une souris Chr2 au cours de l'EV, SL et du SP.

La barre bleue représente la période de stimulation par optogénétique à 20 Hz avec des pulses de 10 msec pendant 10 sec durant l'EV (A), le SL (B) et le SP (C). L'électromyogramme (EMG) et le potentiel de champ local (LFP) enregistré dans le GD sont illustrés. Un effet est clairement visible sur le LFP dans les trois cas. En revanche, un changement comportemental visible sur l'EMG n'est obtenu que pendant le SL et l'EV.

3.1.2 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL dans le GD sur les caractéristiques du LFP

L'enregistrement du LFP au niveau du GD est de bonne qualité. Nous observons effectivement un beau signal thêta au cours du SP (**Figure 10C**).

Les spectres de puissance au cours du SP calculés avant et pendant la stimulation chez une souris Chr2 sont montrés dans la **Figure 11**. Un pic de fréquence est visible à 20 Hz et dans ses harmoniques (40 Hz, 60 Hz, 80 Hz...) chez les souris Chr2 mais aussi chez les souris témoins (**Figure 12**). Il s'agit donc d'un artefact vraisemblablement induit par la lumière. Ce type d'effet a déjà été rapporté dans la littérature et correspond à l'effet Becquerel dû à l'interaction entre la lumière et l'électrode en métal. Pour l'analyse spectrale par bandes, nous avons donc exclu les fréquences autour de 20, 40, 60, 80, et 100 Hz. La Figure 11 illustre la forte augmentation de la puissance et de la fréquence du thêta au cours de l'EV et du SP par rapport à la période précédant la stimulation chez une souris Chr2 représentative.

La puissance du gamma est également augmentée au cours de l'EV et du SP. Ce résultat est confirmé par les analyses quantitatives et l'analyse en temps-fréquence (**Figure 13**).

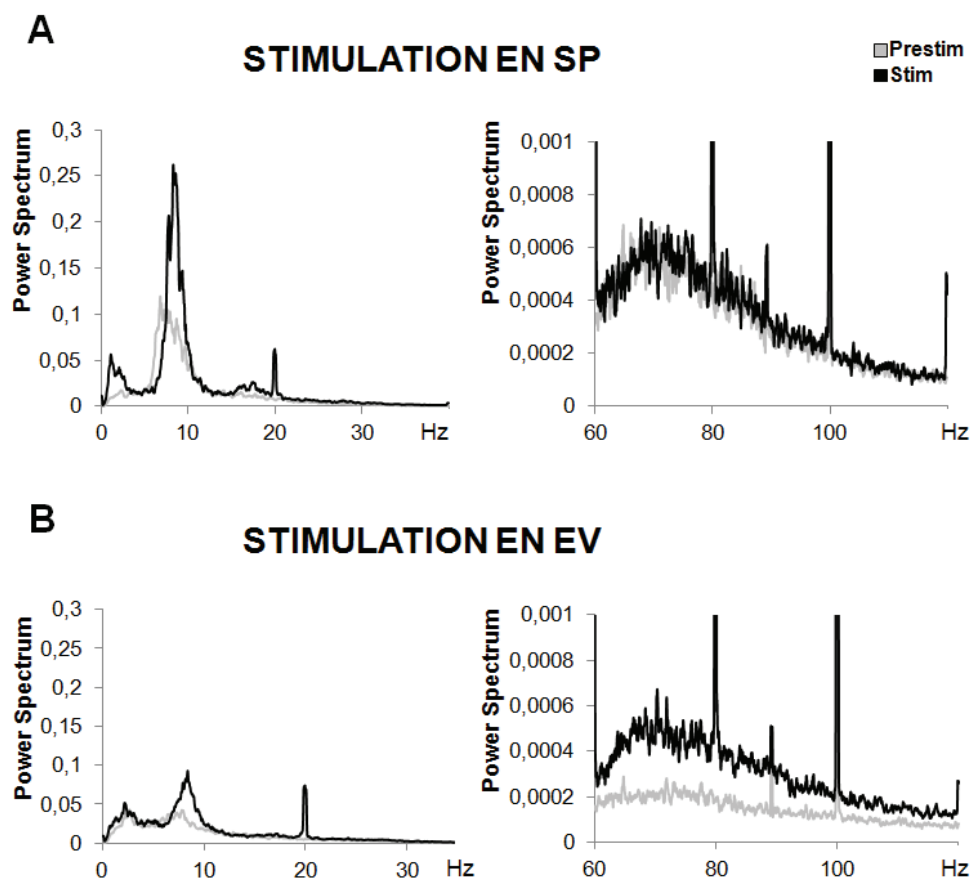


Figure 11. Illustration des spectres de puissance du LFP entre 0- 40 Hz et 60-120 Hz chez une souris ChR2 avant et pendant la stimulation optogénétique au cours du SP (A) et de l'EV (B).

La stimulation optogénétique (20 Hz 10 sec, pulses de 10 msec, durant 4 h) au cours du SP induit une augmentation significative de la puissance du thêta et du gamma par rapport à la période précédant la stimulation. La stimulation au cours de l'EV augmente la puissance du gamma. A noter l'artefact de stimulation à 20 Hz et dans ses harmoniques.

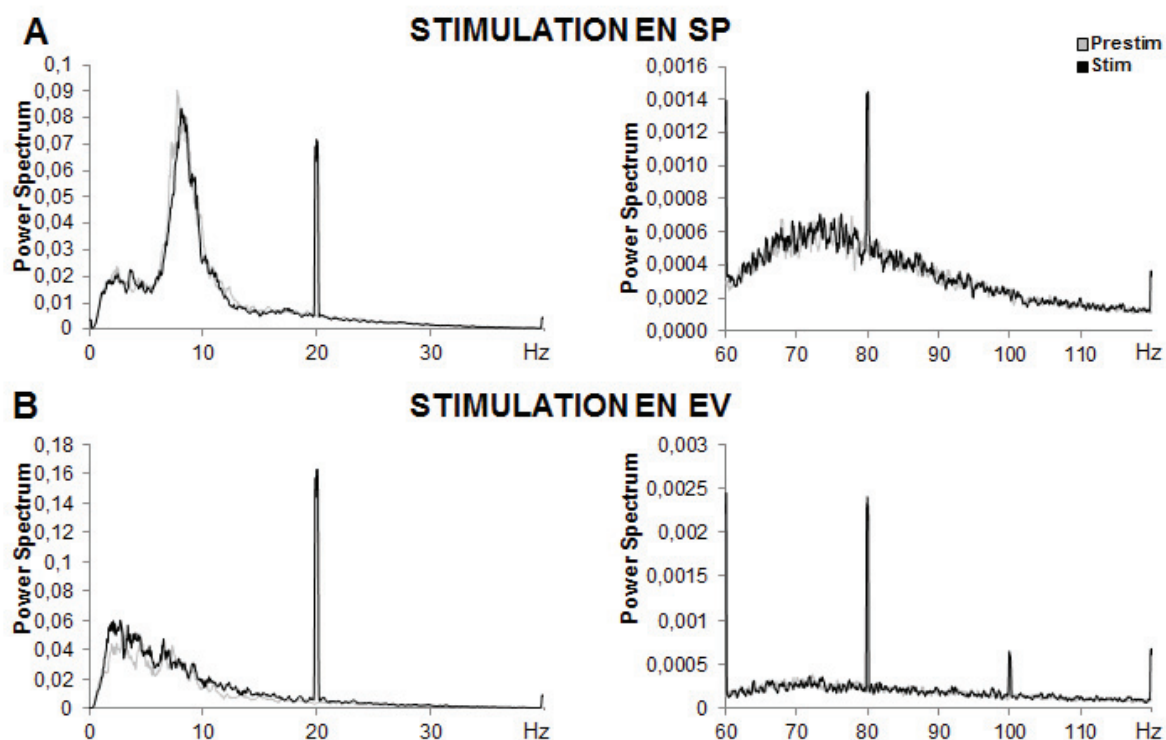


Figure 12. Illustration des spectres de puissance du LFP entre 0- 40 Hz et 60-120 Hz chez une souris témoin avant et pendant la stimulation optogénétique au cours du SP (A) et de l'EV (B).

La stimulation optogénétique (20 Hz 10 sec, pulses de 10 msec, durant 4 h) n'induit aucun changement au niveau spectrale. A noter l'artefact de stimulation à 20 Hz et dans ses harmoniques.

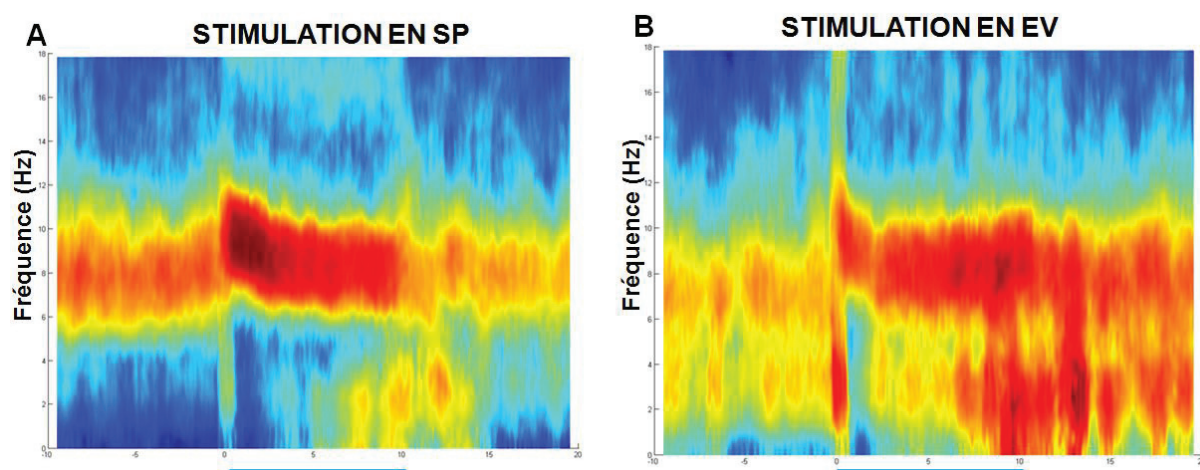


Figure 13. Illustration d'une analyse temps-fréquence du LFP d'une souris Chr2 pendant la stimulation du GD au cours du SP avec la lumière bleue .

La barre bleue représente la période de stimulation optogénétique (20 Hz 10 sec avec des pulses de 10 msec). La stimulation induit une nette réduction des ondes lentes et une augmentation de la puissance et de la fréquence du θ , à la fois au cours du SP (A) et de l'EV (B).

En analysant les rapports de puissances dans les bandes de fréquence d'intérêt entre les valeurs obtenus pendant et avant la stimulation optogénétique dans le LFP, nous observons chez le groupe ChR2 par rapport au groupe témoin:

- au cours de l'EV, une augmentation significative de la puissance du rapport thêta/delta et de celle du gamma (**Figure 14A**);
- au cours du SL, une réduction significative de la puissance du delta et du thêta et une augmentation significative du rapport thêta/delta (**Figure 14B**);
- au cours du SP, une augmentation significative de la puissance du thêta et du gamma (**Figure 14C**).

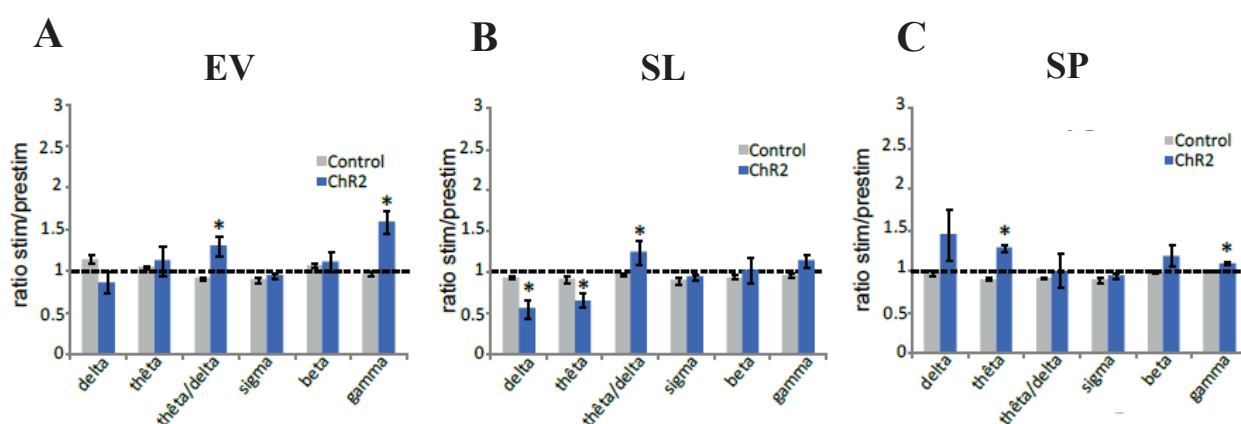


Figure 14. Effet de la stimulation optogénétique du GD avec le laser bleu sur les caractéristiques du LFP.

Rapports de puissance pendant et avant la stimulation optogénétique (20 Hz, 10 sec pendant 4 h avec des pulses de 10 msec) dans les différentes bandes de fréquence (delta, thêta, thêta/delta, sigma, beta, gamma) du LFP chez les souris ChR2 (n=4) et les souris témoins (n=4) au cours de EV (A), SL (B) et SP (C) et de (B). Significativité: Mann Whitney: *p<0.05.

En analysant la fréquence au pic de l'onde thêta dans le LFP avant et pendant la stimulation optogénétique au cours de l' EV et du SP , nous observons chez le groupe ChR2 par rapport au groupe témoin:

- pendant la stimulation au cours de l'EV, une augmentation non significative de la fréquence au pic de l'onde thêta (**Figure 15A**);
- pendant la stimulation au cours du SP, une augmentation significative de la fréquence au pic de l'onde thêta (**Figure 15B**).

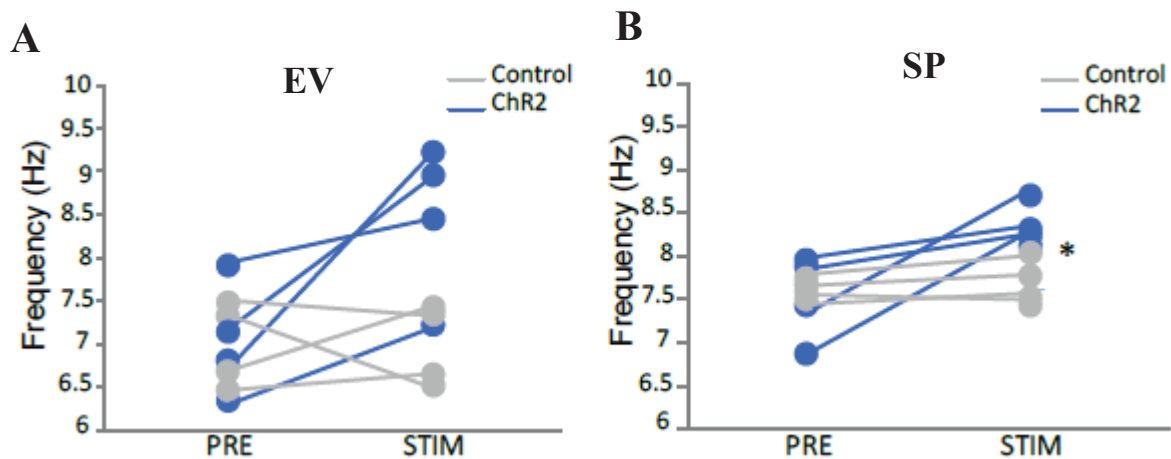


Figure 15. Effet de la stimulation optogénétique du GD avec le laser bleu sur la fréquence au pic du thêta du LFP.

Analyse de la fréquence au pic du thêta avant et pendant la stimulation optogénétique (20 Hz, 10 sec pendant 4 h avec des pulses de 10 msec) chez le groupe témoin (n=4) et le groupe ChR2 (n=4). Significativité: Mann Whitney. *p<0.05.

3.1.3 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL dans le GD sur les caractéristiques de l'EEG

En analysant les rapports de puissance dans les bandes de fréquence d'intérêt entre les valeurs obtenus pendant et juste avant la stimulation optogénétique, nous observons chez le groupe ChR2 par rapport au groupe témoin:

- au cours de l'EV, une réduction significative de la puissance du delta et une augmentation significative de la puissance du rapport thêta/delta et de celle du gamma (**Figure 16A**);
- au cours du SL, une réduction significative de la puissance du delta et une augmentation significative de celle du rapport thêta/delta et du gamma (**Figure 16B**);
- au cours du SP, une augmentation significative de la puissance du beta et du gamma (**Figure 16C**).

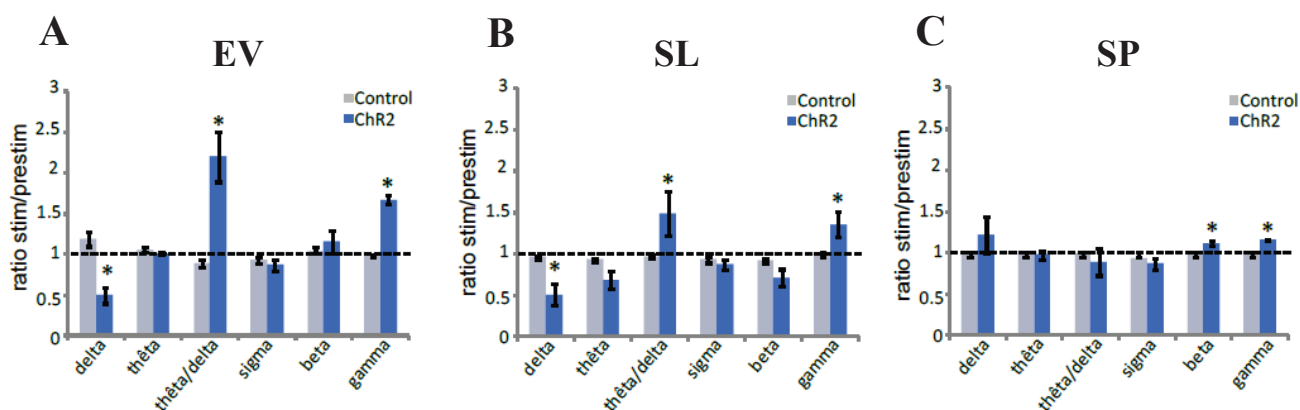


Figure 16. Effet de la stimulation optogénétique du GD avec le laser bleu sur les caractéristiques de l'EEG.

Rapports de puissance pendant et juste avant la stimulation optogénétique (20 Hz, 10 sec pendant 4 h avec des pulses de 10 msec) dans les différentes bandes de fréquence (delta, thêta, thêta/delta, sigma, beta, gamma) de l'EEG chez les souris ChR2 (n=4) et les souris témoins (n=4) au cours de l'EV (A), SL (B) et SP (C). Significativité: Mann Whitney: *p<0.05.

3.1.4 Effet de la stimulation optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur l'expression de FOS

Nous avons stimulé les souris ChR2 (n=4) et les souris témoins (n=4) à 20 Hz pendant 15 min avec des pulses de 10 msec. Chez le groupe ChR2, la stimulation induit une augmentation de l'expression de FOS à la fois dans le GD et dans le Sum par rapport au groupe témoin (**Figure 17**).

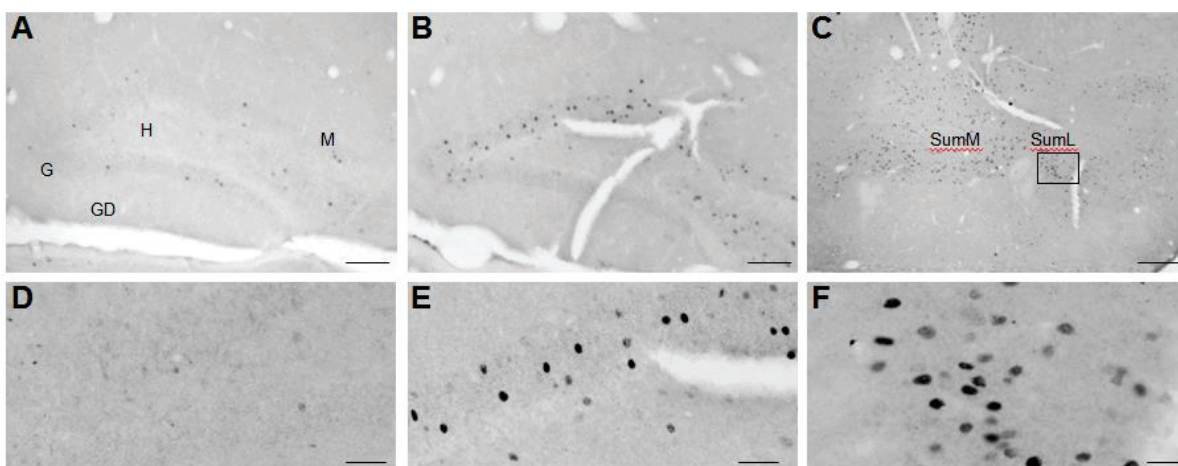


Figure 17. Exemple de marquage FOS chez une souris témoin et une souris ChR2 après stimulation optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD.

La stimulation est réalisée à une fréquence de 20 Hz pendant 10 min.

(A) Marquage FOS dans le GD chez une souris témoin;

(B) marquage FOS dans le GD chez une souris ChR2;

(C) marquage FOS dans le Sum médian (SumM) et latéral (SumL) chez une souris ChR2.

(D), (E) et (F) sont des illustrations à plus fort grossissement de (A), (B) et (C), respectivement.

Echelle : 500 µm en (A), (B) et (C) ; 50 µm en (D), (E) et (F).

Nous avons quantifié le nombre de neurones FOS+ dans le dGD chez les souris ChR2 (n=3) et une souris témoin. Le comptage n'a pas encore été réalisé pour toutes les souris car les immunomarquages sont en cours. La quantification sur trois souris montre cependant déjà une augmentation du nombre de neurones exprimant le FOS dans la couche suprapyramidale du GD chez le groupe ChR2 par rapport au groupe témoin. En revanche, l'augmentation du nombre de neurones FOS+ dans la couche infrapyramidale est beaucoup plus limitée (**Figure 18**).

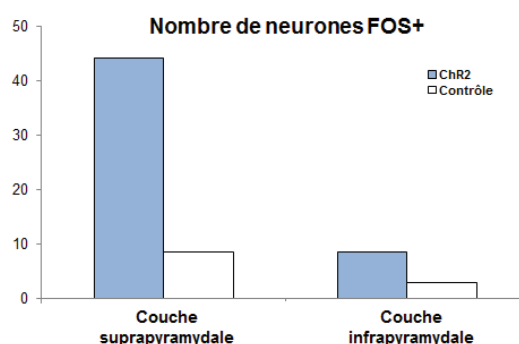


Figure 18. Nombre de neurones FOS+ dans le dGD après stimulation optogénétique avec laser bleu.

Les souris ChR2 (n=3) et la souris témoin ont été stimulées à 20 Hz pendant 10 min avant d'être euthanasiées. Notez l'augmentation de l'expression du FOS dans la couche suprapyramidale du dGD chez les souris ChR2 par rapport à la souris témoin.

3.2 eNPh3.0

3.2.1 Effet de l'inhibition optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur l'architecture des états de vigilance

L'inhibition en continu pendant 10 sec de l'activité des fibres du SumL localisées dans le GD durant chaque état de vigilance pendant 4 h ne semble pas induire de changements comportementaux chez les souris eNPh3.0 et les témoins (**Figure 19**).

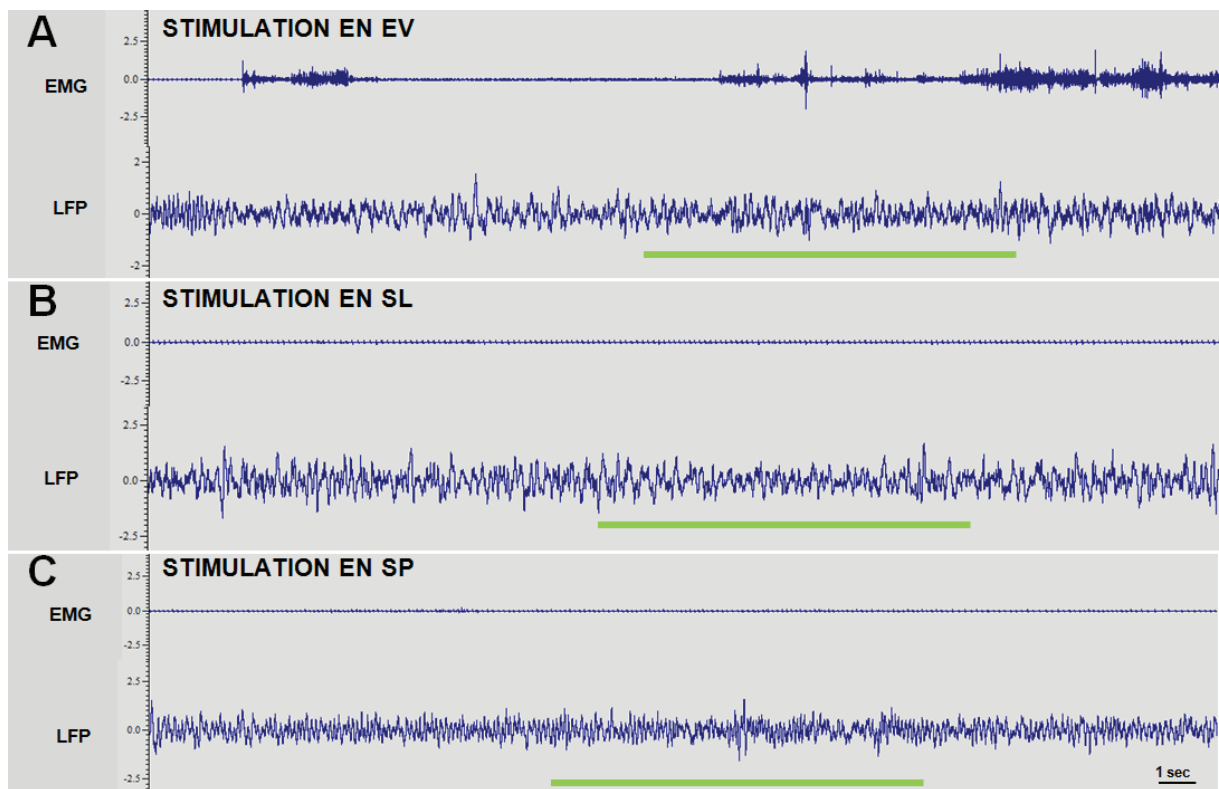


Figure 19. Exemple d'enregistrement chez une souris eNPh3.0. La barre verte représente la période pendant laquelle la stimulation optogénétique est réalisée en continu pendant 10 sec durant EV (A), le SL (B) et le SP (C). En haut est représenté l'électromyogramme (EMG) et en bas le potentiel de champ local (LFP) dans le GD.

3.2.2 Effet de l'inhibition optogénétique des fibres du SumL localisées dans le GD sur les caractéristiques du LFP et de l'EEG

En analysant sur le LFP et l'EEG les rapports de puissances dans les bandes de fréquence d'intérêt entre les valeurs obtenus pendant et avant la stimulation optogénétique, nous observons chez le groupe eNPh3.0 par rapport au groupe témoin:

- au cours de l'EV, une augmentation significative de la puissance du sigma dans le LFP (**Figure 20A**); aucune différence n'est visible dans les autres bandes analysées, ni dans l'EEG (**Figure 20B**);

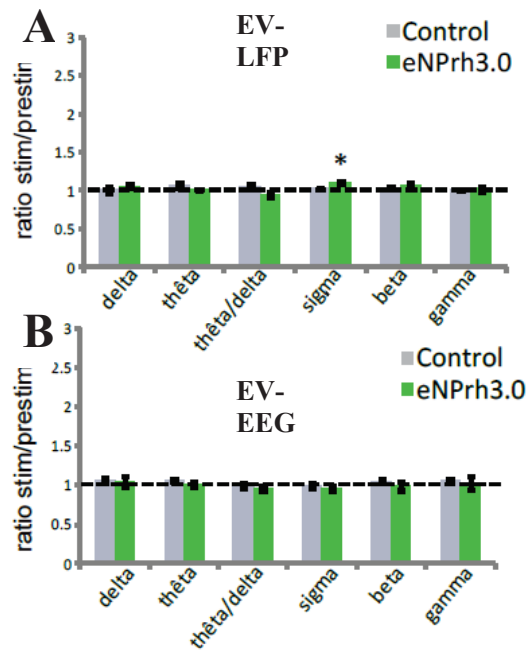


Figure 20. Effet de la stimulation du GD avec le laser vert sur les caractéristiques du LFP et de l'EEG pendant l'EV.

Rapports de puissance pendant et avant la stimulation optogénétique (en continu, 10 sec pendant 4 h) dans les différentes bandes de fréquence (delta, thêta, thêta/delta, sigma, beta et gamma) pour le LFP (A) et l'EEG (B) chez les souris eNPh3.0 (n=4) et les souris témoins (n=3) au cours de l'EV.

- au cours du SL, nous n'observons pas de différences significatives entre le groupe eNPh3.0 et les témoins dans les bandes analysées, ni dans le LFP (**Figure 21A**), ni dans l'EEG (**Figure 21B**);

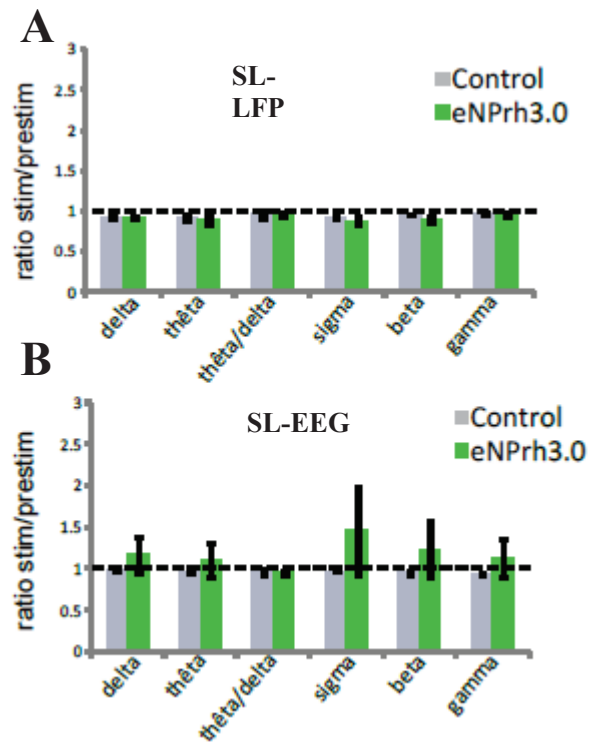


Figure 21. Effet de la stimulation du GD avec le laser vert sur les caractéristiques du LFP et de l'EEG pendant le SL.

Rapports de puissance pendant et avant la stimulation optogénétique (en continu, 10 sec pendant 4 h) dans les différentes bandes de fréquence (delta, thêta, thêta/delta, sigma, beta et gamma) pour le LFP (**A**) et l'EEG (**B**) chez les souris eNPh3.0 (n=4) et les souris témoins (n=3) au cours du SL.

- au cours du SP, nous observons seulement une augmentation significative de la puissance du sigma dans le signal LFP chez les souris eNPh3.0 comparées aux témoins. Pas de différences sont présentes dans les autres bandes analysées, (**Figure 22A**) ni dans le l'EEG (**Figure 22B**).

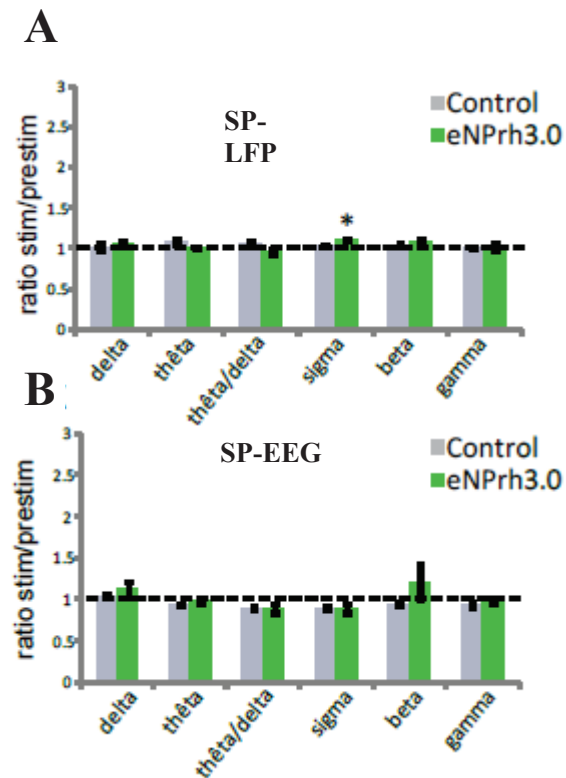


Figure 22. Effet de la stimulation du GD avec le laser vert sur les caractéristiques du LFP et de l'EEG pendant le SP.

Rapports de puissance pendant et avant la stimulation optogénétique (en continu, 10 sec pendant 4 h) dans les différentes bandes de fréquence (delta, thêta, thêta/delta, sigma, beta et gamma) pour le LFP (**A**) et l'EEG (**B**) chez les souris eNPh3.0 (n=4) et les souris témoins (n=3) au cours du SP.

Discussion

Ce travail de thèse nous a permis de mettre au point la technique d'optogénétique au laboratoire. Etant donc une mise au point, nous avons très souvent changé de méthodologies. Les nombreux problèmes techniques rencontrés au cours de nos expériences nous ont donné très souvent de résultats négatifs mais nous ont permis de progressivement améliorer la technique.

1. Considérations méthodologiques

1.1 AAV et modalité d'injection

Au cours de nos expériences nous avons changé de sérotype en passant d'un AAV2 à un AAV5. Comme déjà discuté dans le paragraphe 1.3 des Matériels et Méthodes, les sérotypes d'AAV diffèrent essentiellement dans la composition de la capside. Ces différences anatomiques jouent un rôle dans les modalités d'interaction avec les cellules et les niveaux d'efficacité de transfection. Il a été ainsi montré que les AAV5 et 9 présentent une meilleure transfection au niveau du SNC par rapport aux autres AAVs (Wu et al., 2006; McCown, 2011; Aschauer et al., 2013).

Au cours de ce travail, nous avons constaté que la transfection induite par l'AAV2 ne semble pas être optimal pour les cellules vGLUT2 du Sum. Malgré la bonne localisation de la canule d'injection au-dessus du Sum, dans les premières expériences nous avons très souvent observé un nombre consistant de cellules transfectées dans le corps mammillaires plutôt que dans le Sum, alors que les deux régions sont adjacentes. De plus, nous avons observé que quelques fibres fluorescentes dans le GD et nous étions obligés de réaliser l'amplification du signal par immunohistochimie de la protéine EYFP au fin d'observer des fibres. En revanche, dans l'expérience final en collaboration avec M Esclapez nous avons observé beaucoup de fluorescence dans toute la région du Sum. Nous avons aussi observé de nombreuses fibres

transfectées dans le GD, bien visibles en fluorescence endogène sans nécessité de réaliser l'immunohistochimie. L'AAV5 induit donc clairement une meilleure transfection dans les cellules du Sum.

Un autre aspect concernant l'AAV est sa modalité d'injection.

Si au début nous avons injecté l'AAV2 avec un système de canule connecté à un cathéter relié à une seringue Hamilton, ensuite nous avons descendu l'aiguille d'Hamilton directement dans le Sum sans avoir à percer la dure-mère. Cette méthode nous a permis de ne pas perdre de liquide et de ne pas abimer la surface corticale en enlevant la dure mère.

Par ailleurs, si au début de nos expériences nous avons réalisé les injections très lentement (nous attendions 5 min avant de débiter l'injection des AAV), maintenant, une fois l'aiguille en place dans le cerveau, nous avons débuté immédiatement l'injection de l'AAV, à une vitesse 4 fois supérieure à celle d'avant. De cette manière nous avons donc limité la possibilité d'obturation du bout de l'aiguille pendant l'injection.

Au cours de nos expériences nous avons aussi augmenté le volume d'AAV injecté: nous avons injecté le double du volume et ça nous a permis d'être sûr de bien transfecter toute la région du Sum.

Les résultats d'optogénétique *in vitro* confirment la faible efficacité de l'AAV2: en effet, *in vitro* nous observons des réponses glutamatergiques et GABAergiques des cellules granulaires à la stimulation des fibres du Sum ce qui confirme le double phénotype des cellules du Sum projetant au GD (Soussi et al., 2010). Cependant, les réponses des cellules granulaires sont de très faible amplitude (< 0.1 mV), suggérant que l'expression du ChR2 n'est pas suffisante dans les axones des neurones du SumL pour induire un effet très significatif.

1.2 Fibres optiques utilisées et procédure chirurgicale d'implantation

Au cours du temps nous avons aussi changé de système de fibre optique: en effet, dans nos premières expériences nous avons implanté un guide canule dans le Sum et ensuite nous avons inséré la fibre optique, reliée de l'autre côté directement au laser. Cette méthodologie n'a pas été efficace: très souvent la fibre optique, qui était donc très longue, s'est cassée dans le cerveau pendant l'insertion. Par ailleurs, vu que tout le système devait être fixé avec de la

colle, la fibre s'est détachée plusieurs fois quand il n'y avait pas suffisamment de colle ou si celle-ci n'était pas suffisamment sèche.

Ensuite, nous sommes passés à un système de fêrûle: la fibre optique a été directement insérée dans le cerveau et reliée au laser par un câble (patch câble). Celui-ci est constitué par une fibre optique qui présente à une extrémité une fêrûle insérée dans un adaptateur (sleeve) qui se branche sur la tête de la souris et à l'autre extrémité un connecteur qui se lie au laser. Ce système a été beaucoup plus efficace et stable par rapport à celui utilisant les canules et nous avons pu facilement fixer la fibre optique au crâne avec du ciment dentaire pour qu'elle ne bouge pas.

Enfin, pour nous assurer que la lumière arrivait dans la région cible nous avons modifié les coordonnées d'implantation de la fibre optique: si au début des expériences elle a été placée 500 μm au-dessus du Sum, maintenant elle a été implantée 300 μm au-dessus du GD.

1.3 Stimulations lumineuses

Il n'existe pas beaucoup d'études sur la modalité de décharge des neurones du Sum, donc nous ne connaissons pas les fréquences optimales de stimulation de ces neurones, particulièrement *in vivo* et au cours du SP.

Pour les stimulations inhibitrices jaunes et vertes nous avons allumé la lumière en continu, ce qui est très commun dans la littérature (Raimondo et al., 2012; Tsunematsu et al., 2011).

Pour les stimulations excitatrices bleues, nous avons utilisé la fréquence de stimulation de 20 Hz. nous avons observé un artefact de stimulation. En effet, la stimulation à 20 Hz induit un grand pic de puissance dans le LFP et l'EEG à la fréquence de 20 Hz et dans ses harmoniques, à la fois chez les souris ChR2 et chez les témoins.

Il existe principalement deux types d'artefacts dus à l'interaction entre la lumière et les électrodes: l'effet photoélectrique et l'effet Becquerel. L'effet photoélectrique se produit lorsque des électrons sont émis par une surface métallique en réponse à la lumière, et nécessite généralement des longueurs d'onde dans la gamme de l'ultraviolet.

L'effet Becquerel est provoqué par l'illumination inégale des électrodes placées dans un électrolyte. Les artefacts de lumière visibles pendant nos expériences d'optogénétique sont dus à l'effet Becquerel. Cet artefact produit dans le LFP est ensuite transmis à travers le tissu

biologique par conduction volumique, et donc est visible aussi dans l'EEG. Normalement ces artefacts ont une durée d'environ deux fois la longueur de la stimulation lumineuse, mais si l'intensité lumineuse est très élevée, ils peuvent durer plus longtemps. C'est pour cette raison qu'au cours de nos expériences nous avons réduit la puissance de la stimulation, en passant de 40 mW (à la sortie de la fibre optique) à environ 10 mW. Cependant, nous ne sommes pas arrivés à faire disparaître l'artefact de nos enregistrements.

En utilisant la fréquence de stimulation de 20 Hz nous avons donc observé un artefact à 20 Hz et dans ses harmoniques, mais pas dans les fréquences du delta et du thêta qui nous intéressent pour étudier le sommeil. Par ailleurs, la présence de cet artefact de stimulation nous a empêchés de normaliser les valeurs de puissance dans les bandes de fréquence d'intérêt (delta, thêta, sigma, beta, gamma) par rapport à la puissance de tout le spectre de fréquences. De plus, pour l'analyse de la puissance dans les fréquences du gamma, nous avons exclu de l'analyse les valeurs de puissance à 20 Hz et dans ses harmoniques. L'effet Becquerel dépend de l'exposition directe de l'électrode d'enregistrement à la lumière. Il est donc d'autant plus important que l'électrode est proche de la source de lumière. En conséquence, la meilleure façon d'éviter l'artefact lumineux serait d'éloigner les électrodes de la fibre optique. Dans le cadre de notre étude, il faudrait placer la fibre optique dans le Sum plutôt que le GD. Cependant, de cette manière nous ne pourrions plus étudier spécifiquement la voie du Sum au GD. En effet, les neurones du Sum mais aussi des régions adjacentes seraient stimulés.

Une solution plus efficace, qui permettrait d'éviter l'effet Becquerel sans perdre de spécificité, serait d'utiliser des électrodes insensibles à cet effet électrique. Une alternative aux électrodes en tungstène serait une électrode en verre ou une électrode recouverte d'ITO, un polymère d'oxyde d'indium et d'étain (Han, 2012).

2. Interprétation des résultats

2.1 Effet de la stimulation optogénétique sur les états de vigilance

La stimulation par le laser bleu des fibres du Sum projetant au GD induit un effet d'éveil chez les souris stimulées au cours du SL et pas du SP.

Le fait que nous n'induisons pas d'éveil quand la stimulation a lieu au cours du SP est peut-être dû au fait que nous activons une voie déjà active, donc les modifications résultantes sont mineures, l'animal ne perçoit pas d'évènement anormaux et ne se réveille pas.

En revanche, lors de la stimulation au cours du SL, nous activons une voie qui normalement est inactive pendant cet état ce qui induit un signal d'alerte chez l'animal et donc son réveil. On peut imaginer que la stimulation du GD pourrait induire la réactivation de mémoires et de structures impliquées dans l'exploration ce qui réveillerait l'animal.

La stimulation pendant l'EV induit une augmentation des quantités d'EV et de l'activité exploratrice et locomotrice. Ce résultat confirme les données de la littérature qui ont déjà décrit une augmentation de l'activité exploratrice chez des souris ChR2 stimulées avec la lumière bleue dans le dGD et pas dans le vGD (Kheirbek et al., 2013). Sur la base de cette différence d'effet dans le dGD et vGD les auteurs proposent que le dGD puisse moduler les structures impliquées dans l'exploration, comme le septum latéral et l'aire tegmentale ventrale (Kheirbek et al., 2013, Luo et al 2011, Swanson 2000).

Par ailleurs, l'implication des neurones glutamatergiques du septum médian dans la régulation du rythme thêta pendant la locomotion a été récemment montré: la stimulation bleue de ces neurones est corrélée avec le rythme thêta de la région CA1 et l'activité locomotrice chez la souris (Fuhrmann et al., 2015). Nos résultats suggèrent que les neurones vGLUT2 du Sum pourraient être responsables de cette régulation au cours du SP.

Pas d'effets comportementaux évidents sont obtenus par l'inhibition des fibres du Sum présentes dans le GD. En effet la zone inhibée est limitée dans l'espace et le GD reçoit aussi d'autres projections excitatrices en provenance d'autres régions cérébrales (le mENT notamment), ainsi la voie en provenance du Sum est arrêtée partiellement par optogénétique, et les autres voies restent actives ce qui peut expliquer l'absence d'effet comportemental global. Ce résultat était donc attendu.

2.2 Effet de la stimulation optogénétique sur les caractéristiques de l’LFP et de l’EEG

L’augmentation de la puissance et de la fréquence du rythme thêta au cours du SP et de l’EV pendant la stimulation bleue suggère un rôle clef du Sum dans la régulation du rythme thêta de l’hippocampe.

Le pic de fréquence du thêta augmente d’au moins 1 Hz entre la période avant la stimulation et la stimulation. Pendant le SP, la fréquence au pic passe de 7.5 à 8.5 Hz, alors que pendant l’EV elle passe de 7 à 8.5 Hz

Il a été montré que la fréquence du thêta en conditions basales est plus élevée pendant le SP que pendant l’EV, et qu’il y a une augmentation de la fréquence du thêta entre l’EV calme et l’EV actif (Vyazovskiy et Tobler, 2005). Donc l’augmentation de la fréquence du thêta pendant la stimulation bleue au cours de l’EV pourrait être due à l’augmentation de l’activité locomotrice de l’animal. Cependant, il faut remarquer que la fréquence au pic pendant la stimulation en SP et EV est la même: 8.5 Hz. Ainsi, on pourrait spéculer que la stimulation optogénétique au cours de l’EV entrainerait le rythme thêta vers les fréquences du SP, la souris passant à un état «SP like». Cet effet semble être confirmé par l’observation du spectre de fréquence du gamma: la puissance du gamma pendant la stimulation en EV rejoint les mêmes valeurs qu’en SP

La réduction de la puissance du delta pendant la stimulation en EV chez le groupe Chr2 par rapport au groupe témoin reflète bien le fait que la souris Chr2 change de comportement, elle passe d’un EV calme ou il y a encore des ondes lentes à un EV très actif et exploratoire.

Nous observons un effet électrophysiologique non seulement sur le LFP mais aussi sur l’EEG. L’électrode EEG est implantée au niveau de l’os pariétal, contra-latéralement par rapport à l’optrode du GD. Nos résultats suggèrent que la stimulation optogénétique provoquerait un effet dans le GD qui serait transmis à l’hippocampe contra-latérale. Néanmoins ces changements globaux pourraient également refléter le fait que la stimulation induit un changement d’état des animaux.

Concernant l’eNpHR3.0, nous n’avons pas observé de changements de puissance et/ou de fréquence dans les bandes thêta et gamma pendant la période d’inactivation chez les souris expérimentales comparées aux témoins. Globalement, la puissance spectrale des souris expérimentales est comparable et similaire à celle des témoins. Une possible explication est

de nature technique: nous avons peut être utilisé un protocole d'inactivation qui n'est pas suffisamment fort pour induire des effets (lumière allumée en continu pendant 10 sec à 10 mW). Une solution à ce problème serait, dans des expériences supplémentaires, d'augmenter la puissance de la lumière verte, ou d'utiliser des trains de stimulations. Une autre possibilité est que dans le GD des mécanismes de compensation se mettent en place au cours de l'inactivation, ce qui empêche la visualisation de changements. Enfin, la zone inhibée est peut-être trop restreinte et l'activation persistente des parties du GD non inhibés suffit à induire les rythmes theta et gamma. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus avec l'eNpHR3.

Ces données sont très prometteuses mais encore préliminaires au vu du faible nombre de souris utilisées et du fait que les contrôles histologiques sont encore en cours aujourd'hui. Il faudrait donc augmenter le nombre de souris par groupe pour confirmer les résultats obtenus.

2.3 Effet de la stimulation optogénétique sur l'expression de FOS

Après stimulation par le laser bleu des fibres du Sum projetant au GD, des neurones FOS+ sont présents dans la couche suprapyramidale et pas dans la couche infrapyramidale du dGD. Ce résultat peut être interprété de deux manières:

- la fibre optique était positionnée trop dorsalement et la lumière n'a excité que les neurones de la couche suprapyramidale. Soutenant cette hypothèse, des données non publiées du laboratoire montrent que la couche infrapyramidale du GD présente le plus grand nombre de neurones FOS+ pendant l'hypersomnie de SP par rapport à la couche suprapyramidale. La couche infrapyramidale semble donc être particulièrement active au cours du SP, au moins chez le rat. Le fait de ne pas avoir observé des neurones FOS+ dans la couche infrapyramidale serait donc vraisemblablement dû à un problème de distance trop importante de la fibre optique;
- l'effet de la stimulation optogénétique est spécifique à la couche suprapyramidale. Soutenant cette deuxième hypothèse, de nombreux travaux ont décrit des différences anatomiques et fonctionnelles entre ces deux couches du GD (voir paragraphes 4.1 et 4.3 de l'Introduction). En particulier, la couche suprapyramidale reçoit deux fois plus de projections du Sum que la

couche infrapyramidale (Wyss et al., 1979) et semble être plus impliquée dans la fonction de séparation de patrons d'information du GD (Schmidt et al., 2012), ce qui suggère un rôle très important du Sum dans la régulation du traitement des informations du GD.

Après stimulation optogénétique nous avons également observé des neurones FOS⁺ dans le Sum. La présence de ces neurones peut être expliquée par une conduction antidromique des potentiels d'action générés au niveau du GD vers le Sum.

Il reste encore à analyser l'effet de la stimulation optogénétique sur l'expression de FOS chez plusieurs animaux. Ces résultats sont donc encore à confirmer.

DISCUSSION GENERALE

1. Résumé des principaux résultats obtenus

Dans cette thèse, nous avons tenté de déterminer les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles du réseau neuronal responsable de l'activation corticale au cours du SP. Pour cela nous avons mené trois études dont nous allons maintenant rappeler les principaux résultats.

1.1 Les neurones corticaux qui sont modifiés au cours du SP

Dans le cadre de l'étude réalisée par Leslie Renouard sur le niveau d'activation corticale au cours du SP chez le rat, j'ai analysé la localisation des neurones exprimant ARC et BDNF chez des animaux perfusés après privation sélective de SP, après la phase de rebond de SP induite par la privation et chez des animaux témoins.

Les résultats indiquent que l'expression de BDNF et d'ARC augmente spécifiquement dans le GD pendant l'hypersomnie de SP par rapport aux autres conditions expérimentales. Par ailleurs, pendant le rebond de SP, l'expression de ces marqueurs augmente significativement par rapport à la condition témoin et augmente ou est similaire par rapport à la privation de SP dans les cortex rétrosplénial, entorhinal médian, amygdalien et le claustrum.

Ces résultats montrent pour la première fois que pendant l'hypersomnie de SP l'expression des protéines impliquées dans l'activation et la plasticité neuronale augmente dans un nombre très limité de structures limbiques. Ils suggèrent également que le GD joue un rôle clef au cours du SP.

1.2 La nature neurochimique des neurones SP-on du Sum

Nous avons montré que les neurones du SumL actifs pendant le rebond de SP ont un double phénotype, glutamatergique et GABAergique. Ensuite, nous avons observé que la lésion neurochimique du Sum induit une réduction de l'expression de FOS et des fibres positives au vGLUT2 dans le dGD et pas dans le vGD pendant l'hypersomnie de SP. Enfin nous avons démontré que le mENT serait responsable de l'activation du vGD au cours de l'hypersomnie de SP.

Ces résultats suggèrent un rôle crucial des neurones glutamatergiques/GABAergiques du Sum dans l'activation du dGD pendant le SP.

1.3 Le rôle pendant le SP de la projection du Sum sur le GD

Pour caractériser fonctionnellement la voie neuronale Sum-GD pendant le SP nous avons mis au point au laboratoire la technique d'optogénétique. Après plusieurs expériences négatives dues au fait que la méthode n'était pas mise au point, nous avons récemment obtenu des résultats très prometteurs.

Ils montrent que l'activation spécifique des fibres glutamatergiques du Sum projetant au dGD au cours du SL induit un effet éveillant, une augmentation de l'EV exploratoire et une augmentation au cours du SP et de l'EV de la puissance et de la fréquence du rythme thêta et gamma enregistré dans le GD et l'EEG. Pendant la stimulation en EV nous observons aussi dans le GD une réduction de la puissance du delta. Par ailleurs, la stimulation semble induire une augmentation de l'expression de FOS dans le dGD chez le groupe ChR2 par rapport au groupe témoin. Des neurones FOS+ peuvent être observés aussi dans le SumL. Ces résultats indiquent que le Sum joue un rôle clef dans la régulation de l'activité du dGD.

L'inhibition des fibres glutamatergiques du Sum projetant au dGD pendant le SL et le SP n'induit pas de changements comportementaux ni spectrales évidentes chez les souris expérimentales comparées aux témoins.

2. Considérations méthodologiques

2.1 Immunohistochimie

L'immunohistochimie indirecte est une technique fiable qui présente l'intérêt d'être à la fois spécifique et très sensible. Elle n'est toutefois pas idéale pour réaliser des analyses quantitatives. En effet, l'intensité du marquage immunohistochimique varie légèrement chez les animaux d'un même groupe expérimental sous l'influence d'un grand nombre de facteurs comme la qualité de la perfusion ou la congélation des cerveaux.

Cependant, en déterminant le nombre de neurones FOS⁺, ARC⁺, vGLUT2⁺ et BDNF⁺ ou la densité optique du marquage dendritique de vGLUT2 sur 4 animaux par groupe, nous avons obtenu des différences significatives dans le nombre de neurones ou l'intensité de marquage dans plusieurs structures hippocampiques et néocorticales. Nos résultats indiquent donc que cette méthode est suffisamment reproductible pour une analyse quantitative. Toutefois, l'augmentation du nombre d'animaux par groupe pourrait permettre de valider statistiquement certaines tendances non significatives.

2.2 Utilisation de FOS comme marqueur d'activation cellulaire indirect

Nous nous sommes focalisés sur la localisation des neurones exprimant le FOS en partant du principe qu'il constitue le meilleur marqueur d'activation cellulaire indirect. Il est important d'expliquer les limites de ce postulat.

Une des limites majeures est que l'expression de FOS peut ne pas être induite alors que l'activité électrique du neurone est élevée (Dragunow et Faull, 1989; Herdegen et Leah, 1998). Par exemple, le cortex visuel, dont les neurones sont très actifs au cours d'une stimulation lumineuse, exprime très faiblement le FOS alors qu'en condition d'EV exploratoire, les neurones FOS⁺ sont présents en plus grand nombre.

Dans les cellules ganglionnaires, plus les intervalles entre les activités phasiques sont longs, plus l'expression du FOS est minimale. L'activation des IEGs est inversement corrélée avec la

durée des intervalles de décharge des potentiels d'action (Fields et al., 1997). Ainsi l'expression soutenue du FOS concernerait plutôt les neurones à décharge tonique. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'expression de FOS dans les neurones corticaux et thalamiques, qui présentent ce type d'activité en bouffés, est faible en SL. Nous pouvons étendre notre hypothèse aux neurones du septum médian qui déchargent en bouffées rythmiques en phase avec l'activité thêta. Ceci expliquerait pourquoi les neurones dit "SP-on" dans le télencéphale basal n'expriment pas le FOS après hypersomnie de SP.

Le FOS peut être induit plus facilement dans certaines régions. Ainsi la LTP induite dans le GD par stimulation haute fréquence de la voie perforante entraîne une augmentation de l'expression de FOS dans les cellules granulaires du GD in vivo (Demmer et al., 1993). La LTP induite dans la région CA1 par stimulation à haute fréquence des collatérales de Schäffer induit une augmentation des neurones ZIF-268+, mais pas des neurones FOS + (Roberts et al., 1996).

Inversement, l'expression de FOS peut augmenter dans les neurones sans être liée à l'activité électrique, par exemple pendant une hypoxie (Roberts et al., 1996). Le FOS n'est pas seulement un marqueur neuronal puisqu'il s'exprime aussi dans les cellules gliales lorsqu'elles sont stimulées électriquement, lors de traumatisme cérébral, d'ischémie, de crises d'épilepsie et de mort cellulaire (Kovacs, 1998).

L'induction de l'activité neuronale et donc de l'expression du FOS est réalisée via l'activation de récepteurs mais leur effet sur son expression n'est pas toujours le même. Par exemple l'induction de FOS est moins fréquente après activation des récepteurs AMPA ou kaïnate par rapport à celle observable après activation des récepteurs NMDA. FOS peut aussi être induit par certaines hormones et neurotrophines (Herdegen et al., 1998).

Le FOS est aussi régulé par le rythme circadien avec des niveaux généralement plus élevés pendant la phase obscure lorsque l'animal est le plus actif (Grassi-Zucconi et al., 1993). Le fait de sacrifier tous nos animaux à la même heure exclut potentiellement les effets circadiens. Cependant, malgré ses limites, cette technique a fait ses preuves. Le marquage FOS a souvent été utilisé afin de définir quelles régions sont impliquées dans un comportement, notamment dans les apprentissages mnésiques. De nombreuses études ont validé l'utilisation de ce marqueur fonctionnel pour mettre en évidence les neurones impliqués dans la régulation des états de vigilance (Sherin et al., 1996; Maloney et al., 1999, 2000; Verret et al., 2003a, 2005, 2006). L'utilisation de FOS reste dans notre cas une technique adéquate pour localiser les neurones activés spécifiquement pendant le SP ou durant la stimulation optogénétique.

2.3 Privation de SP

L'analyse des enregistrements polysomnographiques indique que la méthode de privation de SP par la piscine est efficace et sélective puisqu'elle n'a que peu d'effets sur le SL. Ce protocole est cependant connu pour entraîner des effets aspécifiques comme un stress chronique, l'exposition à un nouvel environnement, des désordres métaboliques (augmentation de la prise alimentaire), une fragmentation du SL, l'exposition de l'animal à un environnement aversif, des modifications dans la thermorégulation, dans la prise alimentaire, et une dépression immunitaire. Néanmoins, la plupart de ces effets sont plutôt associés à une privation de très longue durée (plusieurs semaines) (Bergmann et al., 1989; Kushida et al., 1989). Dans nos conditions, la privation se limite à 78 h.

De plus, le niveau de corticostérone plasmatique ne varie pas significativement entre nos trois groupes de rats.

2.1 Optogénétique

Comme nous l'avons déjà répété plusieurs fois tout le long de ce manuscrit, la technique d'optogénétique a été mise en place au laboratoire grâce à ce travail de thèse. Nous avons très souvent changé de méthodologie et d'approches au cours des années. Finalement nous pouvons affirmer que les problèmes principaux rencontrés étaient dus à l'utilisation d'un serotype de vecteur virale de type 2, qui n'assurait pas une transfection correcte des cellules glutamatergiques du SumL. Ainsi aujourd'hui la technique est opérationnelle au laboratoire. Les détails techniques relatifs à l'optogénétique sont traités dans la partie «Discussion» de l'étude 3.

3. Interprétation des résultats

3.1 Etude 1. Le GD comme structure centrale d'activation au cours du SP

Le fait que l'expression de ARC soit augmentée dans le néocortex (cortex auditif, moteur, somatosensoriel, visuel et piriforme) chez le groupe privé de SP par rapport aux autres groupes d'animaux suggère que les neurones des aires néocorticales sensorielles et motrices sont actifs et subissent une plasticité au cours de la privation de SP et en revanche seraient désactivés pendant le rebond de SP. En revanche, les niveaux d'expression de BDNF ne sont pas modifiés dans ces structures de façon significative entre les 3 groupes d'animaux. Par ailleurs, dans le cortex cingulé antérieur nous observons que l'expression d'ARC augmente chez le groupe privé alors que celle du BDNF augmente chez le groupe rebond par rapport aux autres groupes. Ces différences d'expression de ARC et de BDNF dans le néocortex suggèrent que ces deux protéines jouent un rôle différent dans l'activation corticale au cours du SP.

En revanche, l'expression de ARC et BDNF est augmentée chez le groupe rebond par rapport au groupe témoin et supérieure ou similaire par rapport au groupe privé dans des neurones localisés dans un nombre très limité de structures limbiques: le cortex rétrosplénial, entorhinal médian, amygdalien et le claustrum. Ces résultats indiquent que les neurones activés et subissant une plasticité neuronale au cours de l'hypersomnie de SP sont circonscrit à ces structures limbiques.

Un résultat très important obtenu dans cette étude est que l'expression de ARC et BDNF est augmentée dans le GD chez le groupe rebond par rapport aux deux autres groupes. Ce résultat est totalement nouveau. En effet, de nombreuses études de neuroimagerie chez l'homme montraient une augmentation de l'activation hippocampique pendant le SP par rapport à l'EV mais du fait de la limitation de la résolution de ces méthodes n'avaient pas pu déterminer que l'activation était spécifique au GD (Maquet et al., 1996, 2000, 2005; Ioannides et al., 2009). De plus, chez le chat présentant de grandes quantités de SP après injection de muscimol dans la substance grise périaqueducule de nombreux neurones FOS+ étaient présents dans toutes les zones hippocampiques et pas spécifiquement dans le GD (Sastre et al., 2000). Nos résultats indiquent pour la première fois que le GD serait une structure corticale dans laquelle prendrait place au cours du SP des mécanismes de plasticité et d'activation neuronale uniques.

Il est bien connu que le GD est une structure impliquée dans de nombreux processus d'apprentissage et qu'il est responsable de la séparation des patrons d'information (Schmidt et al., 2012). Le SP est également impliqué dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage. Le GD pourrait donc jouer un rôle clef dans la consolidation mnésique prenant place au cours du SP.

3.2 Etude 2. Nature de la voie SumL-dGD pendant le SP

La majorité des neurones du SumL projetant à l'hippocampe contiennent à la fois du GABA et du glutamate et innervent principalement la couche supragranulaire du dGD. Ces deux neurotransmetteurs seraient contenus dans des vésicules synaptiques distinctes mais dans les mêmes terminaisons au niveau du soma et des dendrites des cellules granulaires (Soussi et al., 2010).

Nos résultats indiquent que 83 et 81% de neurones FOS+ du SumL pendant hypersomnie de SP sont glutamatergiques et GABAergiques, respectivement. Néanmoins, nous n'avons pas réalisé un triple immuno marquage FOS-vGLUT2-vGAT pour montrer directement la colocalisation du vGLUT2 et du vGAT. En effet, un triple marquage est très compliqué sinon impossible à réaliser. Nos résultats sont confirmés par d'autres études. Il a été en effet montré qu'après injection d'un traceur antérograde dans le SumL toutes les fibres du GD marquées avec le traceur expriment aussi vGLUT2 et vGAT (Soussi et al., 2010). Les projections du Sum au GD pourraient permettre à la fois l'hyperpolarisation du soma et la dépolarisation des dendrites des cellules granulaires (Pan et McNaughton, 2002), ce qui leur permettrait de décharger avec une haute précision temporelle. Nous avons aussi clarifié le rôle du SumL dans l'activation du dGD et pas du vGD pendant le rebond de SP. Le SumL projette à la fois sur le dGD et sur le vGD, mais la projection sur le dGD est plus importante (Soussi et al., 2010; Vertes 1992). En effet nous n'observons pas de réduction significative du nombre de neurones FOS+ et de fibres vGLUT2+ dans le vGD après lésion du Sum. Ces résultats confirment que le SumL est impliqué dans l'activation du dGD au cours du rebond de SP et indiquent qu'une autre structure serait responsable de l'activation du vGD pendant cet état. L'injection d'un traceur rétrograde dans le vGD nous a permis de démontrer que cette région serait le mENT. En effet, cette région projette au vGD et le rythme thêta est plus important au cours du SP qu'au cours de l'EV dans cette région (Mitchell et Ranck, 1980). Le cortex entorhinal médian

projette spécifiquement au vGD (Ohara et al., 2013) et semble être impliqué dans la mémoire émotionnelle (Suh et al., 2011), comme le vGD (Kheirbek et al., 2013). Cette région pourrait moduler l'activité du vGD au cours du SP et jouer un rôle dans l'apprentissage.

3.3 Etude 3. Rôle du Sum dans l'activation du dGD au cours du SP

Grace à la mise en place de la technique d'optogénétique au laboratoire, nous avons activé ou inactivé les fibres glutamatergiques en provenance du SumL localisées dans le dGD spécifiquement pendant le SP. Sur la base de nos résultats, le SumL ne semble pas être responsable de la genèse du SP, mais il agirait plutôt comme un modulateur du rythme thêta hippocampique. Il a déjà été proposé que le Sum pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la fréquence et de la puissance du thêta de l'hippocampe (Kirk et McNaughton, 1993). Cependant ces études ont été réalisées sur le rat anesthésié et se sont intéressées principalement à la voie indirecte Sum-GD, qui passe par la voie perforante ou qui provient de la formation réticulée.

A notre connaissance il existe une étude en vivo montrant que la lésion du Sum ne provoque pas de changements au niveau du rythme thêta de l'hippocampe (Thinschmidt et al., 1995). Il faut remarquer que cette étude utilisait des techniques anciennes comme la lésion électrique. En revanche, l'étude récente du laboratoire portée par L. Renouard a mis en évidence pendant l'hypersomnie de SP une réduction de la puissance du thêta et une augmentation de la puissance du sigma dans l'EEG des rats soumis à lésion du Sum par rapport aux rats non lésés. Dans notre cas, nous observons un effet net de l'activation du Sum sur le rythme thêta du DG et de l'EEG, au cours du SP et de l'EV.

Le rythme thêta de l'hippocampe est généré par le septum (Kirk et McNaughton, 1993). Le Sum est actif spécifiquement pendant l'hypersomnie de SP et est responsable de l'activation du GD pendant cet état (Renouard et al., 2015). L'activité du Sum pourrait donc se rajouter à celle du septum spécifiquement au cours du SP et potentialiser le rythme thêta de l'hippocampe pendant cet état.

3.4 Le Sum comme modulateur du GD

Nous avons décrit dans l'introduction le rôle du GD dans la mémoire émotionnelle et le processus de séparation des patrons d'information (McHugh et al., 2007). En particulier, il a été montré que des petites populations de cellules granulaires (2-4% des cellules granulaires totales) s'activent spécifiquement dans un contexte précis. Ces cellules se réactivent à chaque fois que l'animal est réexposé au même contexte (Schmidt et al., 2012). Par ailleurs, la réactivation optogénétique des cellules du GD actives pendant une tâche de conditionnement à la peur est suffisante pour faire exprimer à l'animal un comportement de freezing (Liu et al., 2012). De plus, l'inactivation des cellules du GD activées pendant une tâche de conditionnement à la peur réduit les performances des animaux (Denny et al., 2014). Ces résultats suggèrent que de petits groupes de cellules granulaires sont impliqués dans des apprentissages très spécifiques.

Or, l'hypersomnie de SP induit une augmentation de l'expression de FOS dans le dGD par rapport à d'autres conditions expérimentales (Renouard et al., 2015) et cette expression est importante dans la couche infrapyramidale du dGD (données non publiées du laboratoire). Par ailleurs, l'activation du dGD au cours de l'hypersomnie de SP dépend du SumL, qui est impliqué, comme le GD, dans la mémoire émotionnelle (Renouard et al., 2015; Pan et McNaughton, 2002). Le marquage FOS n'est pas homogène dans le GD après rebond de SP mais il est limité à des petites populations cellulaires. Notre hypothèse est que les groupes spécifiques de cellules granulaires activés au cours de l'hypersomnie de SP sont impliqués dans les mécanismes de mémoire émotionnelle. L'activation de ces petites populations cellulaires serait donc dépendante du SumL au cours du SP.

Cependant, la stimulation optogénétique in vitro des fibres du Sum dans le GD provoque des réponses des cellules granulaires dans 100% des cas (communication personnelle de M Escalpez). Si cette voie est active au cours du SP, elle induit donc une réponse inhibitrice et activatrice chez toutes les cellules granulaires. Comment expliquer dans ces conditions que seulement un nombre limité de cellules granulaires exprime FOS, BDNF et ARC après rebond de SP? Une hypothèse serait que ces cellules sont également excitées par d'autres voies nerveuses. Quelles structures pourraient être responsables de cette activation? Une région qui projette directement au GD, comme le cortex entorhinal est un bon candidat. Il pourrait en effet avoir activation des neurones du GD lorsque les neurones du cortex

entorhinal projetant via la voie perforante et les neurones du Sum déchargeraient de façon synchrone (Pan et McNaughton, 2004). L'activité de ces voies pendant le SP induirait des processus de plasticité synaptique. Grâce à ces mécanismes à la fois activateurs et inhibiteurs, le Sum pourrait donc moduler l'activité de sous populations spécifiques du GD, ce qui entrainerait la modulation du rythme thêta de l'hippocampe et des mécanismes de consolidation mnésique au cours du SP.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse ont répondu à plusieurs questions majeures concernant les mécanismes d'activation corticale qui ont lieu pendant le SP.

Nous avons démontré que le dGD est activé pendant l'hypersomnie de SP par les neurones à double phénotype glutamatergique/GABAergique du SumL. A travers sa projection sur le GD, le Sum semble être responsable de la modulation de la fréquence et de la puissance du rythme thêta au cours du SP, ce qui pourrait être relié aux mécanismes de consolidation mnésique qui ont lieu pendant cet état.

Toutefois, ces travaux soulèvent d'autres questions et hypothèses qui devraient être abordées dans le futur.

1. Analyses à compléter des expériences d'optogénétique en cours

Il faudrait augmenter le nombre d'animaux par groupe pour confirmer nos résultats préliminaires, à la fois pour Chr2 et eNpHR3.0.

De plus, il faudrait finir les analyses des groupes en cours, tout d'abord en comptant les neurones FOS+ dans le GD chez tous les animaux stimulés. Chez les souris Chr2 il serait intéressant de regarder la différence dans l'expression de FOS dans le GD contenant l'optrode et dans le GD contra-latéral. Par cette analyse, nous attendons un nombre significativement inférieur de neurones FOS+ dans le GD contra-latéral par rapport au GD ipsilatéral.

Par ailleurs, il faudrait mieux analyser l'effet d'augmentation de l'activité locomotrice induit par la stimulation optogénétique pendant l'EV. Dans ce but, il faudrait quantifier l'EMG avant et pendant les stimulations lumineuses, et aussi corrélérer l'augmentation de la puissance de l'EMG au cours de la stimulation pendant l'EV avec l'augmentation de la puissance du thêta du LFP et de l'EEG.

Il serait intéressant d'analyser aussi la période «post-stimulation» pour voir si la stimulation optogénétique induit des changements spectrales à plus long terme.

2. Enregistrement unitaire

Une approche sans doute très utile serait d'enregistrer les neurones du GD et du Sum pendant la stimulation optogénétique de la voie Sum-GD au cours du SP. Cette méthode nous permettrait de voir en temps réel les changements d'activité des neurones du GD induits par le Sum.

L'enregistrement des potentiels d'action du Sum serait utile pour connaître les modalités de décharge de ces cellules au cours du SP, et donc pour trouver un protocole adapté de stimulation optogénétique. Il nous permettrait également de déterminer si leur activité est corrélée avec l'onde thêta.

3. Rôle du Sum dans l'apprentissage pendant le SP

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle le Sum jouerait un rôle dans les mécanismes de consolidation mnésique du GD pendant le SP, il serait très intéressant de moduler la voie SumL-dGD à l'aide de l'optogénétique et de déterminer l'effet sur la mémoire émotionnelle.

A ce sujet, il a été démontré que les premières 4 h de SP post-apprentissage sont cruciales pour la consolidation mnésique (Smith and Rose, 1996; Graves et al., 2003). Il serait intéressant de soumettre les souris à un test de conditionnement à la peur et ensuite de les stimuler ou de les inhiber avec la lumière bleue ou verte spécifiquement pendant les épisodes de SP durant 4 h. Notre hypothèse est que la consolidation mnésique émotionnelle sera diminuée, voire abolie après inactivation de cette voie au cours du SP. Au contraire, la consolidation pourrait être augmentée après stimulation de la voie pendant le SP.

En effet, nous avons déjà au laboratoire les outils pour réaliser des tests de conditionnement à la peur contextuelle. De plus, nous avons déjà mis au point le protocole de conditionnement à la peur chez la souris. Ce type d'expérience pourrait donc être mené très rapidement au laboratoire.

Une autre approche serait d'utiliser des AAVs permettant de transfecter dans les neurones d'intérêt des short hairpin RNA (shRNA). Après transfection, les shRNA vont s'hybrider à un type d'ARNm caractéristique de la population neuronale ciblée et ainsi annihiler de manière constitutive et durable leur expression cytoplasmique, empêchant la transcription de la protéine native (McCown, 2011). Le grand avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas d'animaux transgéniques, donc nous permettrait de travailler chez le rat qui est notre modèle de référence. Avec cette technique on pourrait moduler spécifiquement l'activité des neurones glutamatergiques et GABAergiques du Sum pendant le SP. Il faudrait avoir un groupe d'animaux où on empêche la transmission glutamatergique, un groupe où on empêche la transmission GABAergique, un groupe où on empêche les deux. Sur ces trois groupes d'animaux on pourrait observer les différences dans le cycle veille-sommeil et les performances dans une tâche de conditionnement contextuelle à la peur, et démontrer si la contribution des neurones glutamatergiques et GABAergiques est la même où si il existe des différences entre les trois groupes.

De manière similaire, on pourrait activer avec ChR2 les neurones glutamatergiques du Sum et inactiver par shRNA la transmission GABAergique du Sum et vice-versa, pour voir la contribution des composantes glutamate et GABA sur l'activité thêta hippocampique et la consolidation mnésique au cours du SP.

Un autre outil qu'on pourrait utiliser pour comprendre le rôle du dGD dans la mémoire émotionnelle au cours du SP est la technologie TRAP (Targeted Recombination in Active Populations). Cette méthode utilise des souris qui expriment la Cre-recombinase spécifiquement dans les cellules actives (FOS+; Guenther et al., 2013). Grâce à cette nouvelle technologie on pourrait induire l'expression de ChR2 ou eNpHR3.0 spécifiquement dans les neurones FOS+ activés au cours d'un rebond de SP. En insérant une optrode dans le dGD, on pourrait ainsi manipuler spécifiquement l'activité de ces populations de cellules granulaires au cours du SP pour voir l'effet sur l'apprentissage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acsády L, Pascual M, Rocamora N, Soriano E, Freund TF (2000) Nerve growth factor but not neurotrophin-3 is synthesized by hippocampal GABAergic neurons that project to the medial septum. *Neuroscience* 98(1): 23-31.

Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450(7168): 420-4.

Aimone JB, Deng W, Gage FH (2010) Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci* 14(7): 325-37.

Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31(3): 571-91.

Amaral DG, Witter MP (2004) Hippocampal formation. In Paxinos, G (ed) *The rat central nervous system*. 3rd ed, New York: Academic Press, 635-704.

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies) *Prog Brain Res* 163: 3–22.

Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11(1): 8-17.

Aranda L, Santín LJ, Begega A, Aguirre JA, Arias JL (2006) Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolytic-like behavior. *Behav Brain Res* 167(1): 156-64.

Aranda L, Begega A, Sánchez-López J, Aguirre JA, Arias JL, Santín LJ (2008) Temporary inactivation of the supramammillary area impairs spatial working memory and spatial reference memory retrieval. *Physiol Behav* 94(3): 322-30.

Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S (2013) Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PLoS One* 8(9): e76310.

Aserinsky E, Kleitman N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118(3062): 273-4.

Axmacher N, Helmstaedter C, Elger CE, Fell J (2008) Enhancement of neocortical-medial temporal EEG correlations during non-REM sleep. *Neural Plast* 563028.

Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE (2008) Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* 319(5870): 1640-2.

- Ball GG, Gray JA (1971) Septal self-stimulation and hippocampal activity. *Physiol Behav* 6(5): 547-9.
- Bantel-Schaal U, Hub B, Kartenbeck J (2002) Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol* 76(5): 2340-9.
- Beck CH, Fibiger HC (1995) Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15(1 Pt 2): 709-20.
- Bender F, Gorbati M, Cadavieco MC, Denisova N, Gao XJ, Holman C, Korotkova T, Ponomarenko A (2015) Theta oscillations regulate the speed of locomotion via a hippocampus to lateral septum pathway. *Nature communications*, DOI: 10.1038/ncomms9521.
- Berger H (1929) Electroencephalogram in humans. *Archiv Fur Psychiatrie Und Nervenkrankheiten* 87: 527–570.
- Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Fang VS, Leitch CA, Schoeller DA, Refetoff S, Rechtschaffen A (1989) Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. *Sleep* 12(1): 31-41.
- Bernard JF, Alden M, Besson JM (1993) The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol* 329(2): 201-29.
- Blumberg MS, Gall AJ, Todd WD (2014) The development of sleep-wake rhythms and the search for elemental circuits in the infant brain. *Behav Neurosci* 128(3): 250-63.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16(10): 1959-73.
- Bonnevie T, Dunn B, Fyhn M, Hafting T, Derdikman D, Kubie JL, Roudi Y, Moser EI, Moser MB (2013) Grid cells require excitatory drive from the hippocampus. *Nat Neurosci* 16(3): 309-17.
- Borhegyi Z, Leranth C (1997) Substance P innervation of the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 384(1): 41-58.
- Born J, Wagner U (2004) Memory consolidation during sleep: role of cortisol feedback. *Ann N Y Acad Sci* 1032: 198-201.
- Bott JB, Muller MA, Jackson J, Aubert J, Cassel JC, Mathis C, Goutagny R (2015) Spatial reference memory is associated with modulation of theta-gamma coupling in the dentate gyrus. *Cereb Cortex* Sous presse.
- Boucetta S, Cissé Y, Mainville L, Morales M, Jones BE (2014) Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci* 34(13): 4708-27.

- Boulland JL, Jenstad M, Boekel AJ, Wouterlood FG, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2009) Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb Cortex* 19(1): 241-8.
- Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A (2016) Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352(6287): 812-816.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8(9): 1263-8.
- Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15(1 Pt 1): 47-60.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76(2): 99-125.
- Brankack J, Stewart M, Fox SE (1993) Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Research* 615:310-327.
- Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW (2012) Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev* 92(3): 1087-1187.
- Brun VH, Solstad T, Kjelstrup KB, Fyhn M, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2008) Progressive increase in grid scale from dorsal to ventral medial entorhinal cortex. *Hippocampus* 18(12): 1200-12.
- Buchanan TW (2007) Retrieval of emotional memories. *Psychol Bull* 133(5): 761-79.
- Burgalossi A, Brecht M (2013) Cellular, columnar and modular organization of spatial representations in medial entorhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 24(1): 47-54.
- Bush G, Luu P, Posner MI (2000) Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* 4(6): 215-222.
- Bussey TJ, Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW (1996) Dissociable effects of anterior and posterior cingulate cortex lesions on the acquisition of a conditional visual discrimination: facilitation of early learning vs. impairment of late learning. *Behav. Brain Res.* 82: 45-56.
- Buzsáki G, Leung LW, Vanderwolf CH (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 287(2): 139-71.
- Buzsáki G (1998) Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *J Sleep Res* 7 Suppl 1: 17-23.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33(3): 325-40.
- Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B (2003) Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 23(34): 10897-903.

Carnes KM, Fuller TA, Price JL (1990) Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *J Comp Neurol* 302(4): 824-52.

Carre GP, Harley CW (1991) Population spike facilitation in the dentate gyrus following glutamate to the lateral supramammillary nucleus. *Brain Res* 568(1-2): 307-10.

Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, de Lecea L (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* 13(12): 1526-33.

Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA (2005) Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15(5): 579-86.

Choi WK, Wirtshafter D, Park HJ, Lee MS, Her S, Shim I (2012) The characteristics of supramammillary cells projecting to the hippocampus in stress response in the rat. *Korean J Physiol Pharmacol* 16(1): 17-24.

Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, Henninger MA, Belfort GM, Lin Y, Monahan PE, Boyden ES (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463(7277): 98-102.

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1990) Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 302(2): 206-19.

Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325(5937): 210-3.

Clément O, Sapin E, Libourel PA, Arthaud S, Brischoux F, Fort P, Luppi PH (2012) The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. *J Neurosci* 32(47): 16763-74.

Cohen RA, Kaplan RF, Moser DJ et al. (1999) Impairments of attention after cingulotomy. *Neurology* 53(4): 819-824.

Colgin LL, Moser EI (2010) Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology (Bethesda)* 25(5): 319-29.

Conway MA, Anderson SJ, Larsen SF, Donnelly, CM, McDaniel MA, McClelland AG, Rawles RE, Logie RH (1994) The formation of flashbulb memories. *Mem. Cognit* 22: 326-343.

Crick FC, Koch C (2005) What is the function of the claustrum? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1458): 1271-9.

Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37(2): 311-22.

- Dahan L, Astier B, Vautrelle N, Urbain N, Kocsis B, Chouvet G (2007) Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology* 32(6): 1232-41.
- Dash MB, Douglas CL, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Tononi G (2009) Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci* 29(3): 620-9.
- Datta S, Siwek DF (1997) Excitation of the brain stem pedunculo-pontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *J Neurophysiol* 77(6): 2975-88.
- Datta S, Li G, Auerbach S (2008) Activation of phasic pontine-wave generator in the rat: a mechanism for expression of plasticity-related genes and proteins in the dorsal hippocampus and amygdala. *Eur J Neurosci* 27(7): 1876-92.
- Dement W, Kleitman N (1957) The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J Exp Psychol* 53(5): 339-46.
- Demmer J, Dragunow M, Lawlor PA, Mason SE, Lea JD, Abraham WC, Tate WP (1993) Differential expression of immediate early genes after hippocampal long-term potentiation in awake rats. *Brain Res Mol Brain Res* 17(3-4): 279-86.
- Deng W, Mayford M, Gage FH (2013) Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife* 2:e00312.
- Diekelmann S, Born J (2010) The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11(2): 114-26.
- Dolorfo CL, Amaral DG (1998) Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 398(1): 25-48.
- Dragunow M, Faull R (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29(3): 261-5.
- Drosopoulos S, Windau E, Wagner U, Born J (2007) Sleep enforces the temporal order in memory. *PLoS One* 2(4):e376.
- el Mansari M, Sakai K, Jouvet M (1989) Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp Brain Res* 76(3): 519-29.
- Ellenbogen JM, Hulbert JC, Stickgold R, Dinges DF, Thompson-Schill SL (2006) Interfering with theories of sleep and memory: sleep, declarative memory, and associative interference. *Curr Biol* 16(13): 1290-4.
- Eschenko O, Mölle M, Born J, Sara SJ (2006). Elevated sleep spindle density after learning or after retrieval in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci* 26: 12914–12920.

Eschenko O, Ramadan W, Mölle M, Born J, Sara SJ (2008). Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb* 15 : 222–228.

Fanselow MS (1980) Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15: 177–182.

Fields RD, Eshete F, Stevens B, Itoh K (1997) Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca^{2+} , cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci* 17(19): 7252–66.

Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O (1998) Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394(6689): 186–9.

Fort P, Bassetti CL, Luppi PH (2009) Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur J Neurosci* 29(9): 1741–53.

Freund TF, Antal M (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336(6195): 170–3.

Frotscher M, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E (1991) The mossy cells of the fascia dentata: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol* 312(1): 145–63.

Fuhrmann F, Justus D, Sosulina L, Kaneko H, Beutel T, Friedrichs D, Schoch S, Schwarz MK, Fuhrmann M, Remy S (2015) Locomotion, theta oscillations, and the speed-correlated firing of hippocampal neurons controlled by a medial septal glutamatergic circuit. *Neuron* 86: 1253–1264.

Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, de Barreda EG, Ávila J, Hernández F (2011) Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 β . *PLoS One* 6(11): e27262.

Gabriel M (1990) Functions of anterior and posterior cingulate cortex during avoidance learning in rabbits. *Progress in Brain Research* 85: 467–483.

Gall C, Selawski L (1984) Supramammillary afferents to guinea pig hippocampus contain substance P-like immunoreactivity. *Neurosci Lett* 51(2): 171–6.

Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20(11): 4217–25.

Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11(6): 626–36.

Goll Y, Atlan G, Citri A (2015) Attention: the claustrum. *Trends Neurosci* 38(8): 486–95.

Gonzalo-Ruiz A, Alonso A, Sanz JM, Llinás RR (1992) A dopaminergic projection to the rat mammillary nuclei demonstrated by retrograde transport of wheat germ agglutinin

horseradish peroxidase and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 321(2): 300-11.

Goodrich-Hunsaker NJ, Hunsaker MR, Kesner RP (2008) The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behav Neurosci* 122(1): 16-26.

Goutagny R, Jackson J, Williams S (2009) Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12(12): 1491-3.

Gradinaru V, Thompson KR, Deisseroth K (2008) eNpHR: a *Natronomonas* halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol* 36(1-4): 129–139.

Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson KR, Deisseroth K (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141(1): 154-65.

Grassi-Zucconi G, Menegazzi M, De Prati AC, Bassetti A, Montagnese P, Mandile P, Cosi C, Bentivoglio M (1993) c-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. *Eur J Neurosci* 5(8): 1071-8.

Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T (2003) Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem* 10(3): 168-76.

Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1(1): 67-73.

Guenther CJ, Kazunari Miyamichi K, Yang HH, Heller HC, Luo L (2013) Permanent Genetic Access to Transiently Active Neurons via TRAP: Targeted Recombination in Active Populations *Neuron* 78(5): 773–784.

Gulyás AI, Tóth K, McBain CJ, Freund TF (1998) Stratum radiatum giant cells: a type of principal cell in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10(12): 3813-22.

Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D (2005) Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 22(8): 2111-6.

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436(7052): 801-6.

Haglund L, Swanson LW, Köhler C (1984) The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J Comp Neurol* 229(2): 171-85.

Halasy K, Miettinen R, Szabat E, Freund TF (1992) GABAergic Interneurons are the Major Postsynaptic Targets of Median Raphe Afferents in the Rat Dentate Gyrus. *Eur J Neurosci* 4(2): 144-153.

- Halasy K, Hajszan T, Kovács EG, Lam TT, Leranath C (2004) Distribution and origin of vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive fibers in the rat hippocampus. *Hippocampus* 14(7): 908-18.
- Han X, Boyden ES (2007) Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One* 2(3): e299.
- Han X, Chow BY, Zhou H, Klapoetke NC, Chuong A, Rajimehr R, Yang A, Baratta MV, Winkle J, Desimone R, Boyden ES (2011) A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front Syst Neurosci* 5: 18.
- Han X (2012) In Vivo Application of Optogenetics for Neural Circuit Analysis. *ACS Chem Neurosci* 3(8): 577–584.
- Han Y, Shi YF, Xi W, Zhou R, Tan ZB, Wang H, Li XM, Chen Z, Feng G, Luo M, Huang ZL, Duan S, Yu YQ (2014) Selective activation of cholinergic basal forebrain neurons induces immediate sleep-wake transitions. *Curr Biol* 24(6): 693-8.
- Hassani OK, Lee MG, Henny P, Jones BE (2009a) Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* 29(38): 11828-40.
- Hassani OK, Lee MG, Jones BE (2009b) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2418-22.
- Hasselmo ME, Stern CE (2014) Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time. *Neuroimage* 85 (2): 656-666.
- Hennevin E, Leconte P (1971) The function of paradoxical sleep: facts and theories. *Annee Psychol* 71(2): 489-519.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28(3): 370-490.
- Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ (2008) The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiol Learn Mem* 90(3): 553-9.
- Hinman JR, Penley SC, Long LL, Escabi MA, Chrobak JJ (2011) Septotemporal variation in dynamics of theta: speed and habituation. *J Neurophysiol* 105:2675-2686.
- Hobson JA, Pace-Schott EF (2002) The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* 3(9): 679-93.
- Houser CR (2007) Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog Brain Res* 163: 217-32.

Ikemoto S, Murphy JM, McBride WJ (1997) Self-infusion of GABA(A) antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions. *Behav Neurosci* 111(2): 369-80.

Ikemoto S, Witkin BM, Zangen A, Wise RA (2004) Rewarding effects of AMPA administration into the supramammillary or posterior hypothalamic nuclei but not the ventral tegmental area. *J Neurosci* 24(25): 5758-65.

Ino T, Itoh K, Sugimoto T, Kaneko T, Kamiya H, Mizuno N (1988) The supramammillary region of the cat sends substance P-like immunoreactive axons to the hippocampal formation and the entorhinal cortex. *Neurosci Lett* 90(3): 259-64.

Ioannides AA, Kostopoulos GK, Liu L, Fenwick PB (2009) MEG identifies dorsal medial brain activations during sleep. *Neuroimage* 44(2): 455-68.

Irmak SO, de Lecea L (2014) Basal forebrain cholinergic modulation of sleep transitions. *Sleep* 37(12): 1941-51.

Ishizuka N (2001) Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J Comp Neurol* 435(1): 89-110.

Iso H, Simoda S, Matsuyama T (2007) Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behavioural Brain Research* 179(1): 90-98.

Jackson J, Amilhon B, Goutagny R, Bott JB, Manseau F, Kortleven C, Bressler SL, Williams S (2014) Reversal of theta rhythm flow through intact hippocampal circuits. *Nat Neurosci* 17(10): 1362-70.

Jego S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR (2013) Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci* 16(11): 1637-43.

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE (2011) Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147: 509–524.

Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S (2001) A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4(3): 289-96.

Jones BE (2004) Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145: 157-69.

Jones BE (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci* 26(11): 578-86.

Jouvet M, Michel F, Courjon (1959) On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep. *C R Seances Soc Biol Fil* 153: 1024-8.

Jouvet M, Michel F (1959) Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat. *C R Seances Soc Biol Fil* 153(3): 422-5.

Jouvet M, Jeannerod M, Mouret J (1964) structural and pharmacological analysis of eye movements during the paradoxal sleep phase in the cat. *C R Seances Soc Biol Fil* 158: 760-3.

Jouvet M (1965a) Electrophysiologic and neuropharmacologic study of the stages of sleep. *Actual Pharmacol (Paris)* 18: 109-73.

Jouvet M, (1965b) The paradoxical phase of sleep. *Int J Neurol* 5(2): 131-50.

Jouvet M, (1979) Le comportement onirique. *Pour la science* 25: 136-152.

Jouvet M, (1980) Paradoxical sleep and the nature-nurture controversy. *Prog Brain Res* 53: 331-46.

Jouvet-Mounier D, Astic L, Lacote D (1970) Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol* 2(4): 216-39.

Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci* 14(12): 7347-56.

Katche C, Dorman G, Slipczuk L, Cammarota M, Medina JH (2013) Functional integrity of the retrosplenial cortex is essential for rapid consolidation and recall of fear memory. *J Neurosci* 33(4): 170-3.

Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2317-21.

Kayama Y, Ohta M, Jodo E (1992) Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res* 569(2): 210-20.

Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23(12): 5354-60.

Kesner RP (2013) An analysis of the dentate gyrus function. *Behav Brain Res* 254: 1-7.

Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77(5): 955-68.

Kirk IJ, McNaughton N (1991) Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport* 2(11): 723-5.

Kirk IJ, McNaughton N (1993) Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus* 3(4): 517-25.

Kirk IJ, Oddie SD, Konopacki J, Bland BH (1996) Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J Neurosci* 16(17): 5547-54.

Kiss J, Csáki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranth C (2000) The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [³H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* 97(4): 657-69.

Kiss J, Csáki A, Bokor H, Kocsis K, Kocsis B (2002) Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [(3)H]D-aspartate labelling and immunocytochemistry. *Neuroscience* 111(3): 671-91.

Kitamura T, Pignatelli M, Suh J, Kohara K, Yoshiki A, Abe K, Tonegawa S (2014) Island cells control temporal association memory. *Science* 343(6173): 896-901.

Kitsikis A, Steriade M (1981) Immediate behavioral effects of kainic acid injections into the midbrain reticular core. *Behav Brain Res* 3(3): 361-80.

Kiyama H, Shiosaka S, Takami K, Tateishi K, Hashimura E, Hamaoka T, Tohyama M (1984) CCK pathway from supramammillary region to the nucleus anterior ventralis thalami of the young rats. *Peptides* 5(5): 889-93.

Kocsis B, Vertes RP (1994) Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J Neurosci* 14(11 Pt 2): 7040-52.

Kocsis K, Kiss J, Csáki A, Halász B (2003) Location of putative glutamatergic neurons projecting to the medial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 61(4): 459-68.

Koenig J, Linder AN, Leutgeb JK, Leutgeb S (2011) The spatial periodicity of grid cells is not sustained during reduced theta oscillations. *Science* 332(6029): 592-5.

Köhler C, Swanson LW, Haglund L, Wu JY (1985) The cytoarchitecture, histochemistry and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat. *Neuroscience* 16(1): 85-110.

Konadhode RR, Pelluru D, Blanco-Centurion C, Zayachkivsky A, Liu M, Uhde T, Glen WB Jr, van den Pol AN, Mulholland PJ, Shiromani PJ (2013) Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. *J Neurosci* 33(25): 10257-63.

Konadhode RR, Pelluru D, Shiromani PJ (2015) Neurons containing orexin or melanin concentrating hormone reciprocally regulate wake and sleep. *Front Syst Neurosci* 8: 244.

Korman M, Doyon J, Doljansky J, Carrier J, Dagan Y, Karni A (2007) Daytime sleep condenses the time course of motor memory consolidation. *Nat Neurosci* 10(9): 1206-13.

Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33(4): 287-97.

Kovacs KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20(6): 665-72.

- Krettek JE, Price JL (1978) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178(2): 255-80.
- Krnjevic K, Phillis JW (1963) Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. *Br J Pharmacol Chemother* 20: 471-90.
- Kropff E, Yang SM, Schinder AF (2015) Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Curr Opin Neurobiol* 35: 21-6.
- Kushida CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989) Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 12(1): 22-30.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM (2009) Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1265: 103-10.
- Lantos TA, Görös TJ, Palkovits M (1995) Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premammillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Res Rev* 20(2): 209-49.
- Lee I, Solivan F (2010) Dentate gyrus is necessary for disambiguating similar object-place representations. *Learn Mem* 17(5): 252-8.
- Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsáki G (1994) Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 62(4): 1033-47.
- Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE (2005a) Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25(17): 4365-9.
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE (2005b) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep/waking cycle. *J Neurosci* 25(28): 6716-20.
- Lee SH, Dan Y (2012) Neuromodulation of brain states. *Neuron* 76(1): 209-22.
- Leranth C, Kiss J. (1996) A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. *J Neurosci* 16(23): 7699-710.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* 315(5814): 961-6.
- Libourel PA, Corneillie A, Luppi PH, Chouvet G, Gervasoni D (2015) Unsupervised online classifier in sleep scoring for sleep deprivation studies. *Sleep* 38(5): 815-28.
- Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S (2012) Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484: 381-385.
- Louie K, Wilson MA (2001) Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 29(1): 145-56.

Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441(7093): 589-94.

Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, Lupica CR, Aston-Jones G (2011) Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* 333: 353–357.

Luppi PH, Clément O, Sapin E, Gervasoni D, Peyron C, Léger L, Salvert D, Fort P (2011) The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder. *Sleep Med Rev* 15(3): 153-63.

Lydic R, Baghdoyan HA, Hibbard L, Bonyak EV, DeJoseph MR, Hawkins RA (1991) Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat: a preliminary study. *J Comp Neurol* 304(4): 517-29.

Maglóczy Z, Acsády L, Freund TF (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 4(3): 322-34.

Maguire EA (2001) The retrosplenial contribution to human navigation: a review of lesion and neuroimaging findings. *Scand J Psychol* 42(3): 225-38.

Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 19(8): 3057-72.

Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 20(12): 4669-79.

Mann EO, Paulsen O (2005) Mechanisms underlying gamma ('40 Hz') network oscillations in the hippocampus--a mini-review. *Prog Biophys Mol Biol* 87(1): 67-76.

Maquet P, Péters J, Aerts J, Delfiore G, Degueldre C, Luxen A, Franck G (1996) Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* 383(6596): 163-6.

Maquet P, Laureys S, Peigneux P, Fuchs S, Petiau C, Phillips C, Aerts J, Del Fiore G, Degueldre C, Meulemans T, Luxen A, Franck G, Van Der Linden M, Smith C, Cleeremans A (2000) Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nat Neurosci* 3(8): 831-6.

Maquet P, Ruby P, Maudoux A, Albouy G, Sterpenich V, Dang-Vu T, Desseilles M, Boly M, Perrin F, Peigneux P, Laureys S (2005) Human cognition during REM sleep and the activity profile within frontal and parietal cortices: a reappraisal of functional neuroimaging data. *Prog Brain Res* 150: 219-27.

Maquet P, Franck G (1997) REM sleep and amygdala. *Mol Psychiatry* 2(3): 195-6.

Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS (1996) N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci* 110: 1365–1374.

- Marini G, Macchi G, Mancina M (1992) Potentiation of electroencephalographic spindles by ibotenate microinjections into nucleus reticularis thalami of cats. *Neuroscience* 51(4): 759-62.
- Marrone DF, Adams AA, Satvat E (2011) Increased pattern separation in the aged fascia dentata. *Neurobiol Aging* 32(12): 2317.e23-32.
- Martin MM, Horn KL, Kusman KJ, Wallace DG (2007) Medial septum lesions disrupt exploratory trip organization: evidence for septohippocampal involvement in dead reckoning. *Physiol Behav* 90:412-424.
- McCown TJ (2011) Adeno-associated Virus (AAV) Vectors in the CNS. *Curr Gene Ther* 11: 181-8.
- McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG, Magee JC (2003) Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23: 9687–9695.
- McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Fanselow MS, Wilson MA, Tonegawa S (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network *Science* 317: 94-99.
- McNaughton N, Ruan M, Woodnorth MA (2006) Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus* 16:1102-1110.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10(4): 1185-201.
- Mirescu C, Gould E (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16(3): 233-238.
- Mitchell SJ, Ranck JB Jr (1980) Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. *Brain Res* 189(1): 49-66.
- Mitchell SJ, Rawlins JN, Steward O, Olton DS (1982) Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *J Neurosci* 2:292-302.
- Montgomery SM, Sirota A, Buzsáki G (2008) Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 28(26): 6731-41.
- Montoya CP, Sainsbury RS (1985) The effects of entorhinal cortex lesions on type 1 and type 2 theta. *Physiol Behav* 35(1): 121-6.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297(5868): 681-3.
- Morrissey MD, Takehara-Nishiuchi K (2014) Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: a meta-analysis of rodent behavioral studies. *Neurobiol Learn Mem* 115: 95-107.

Moser MB, Moser EI (1998) Functional Differentiation in the Hippocampus. *Hippocampus* 8: 608–619.

Mueller AD, Mear RJ, Mistlberger RE (2011) Inhibition of hippocampal neurogenesis by sleep deprivation is independent of circadian disruption and melatonin suppression. *Neuroscience* 193: 170-181.

Myers CE, Scharfman HE (2011) Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection. *Hippocampus* 21, 1190-1215.

Nakanishi K, Saito H, Abe K (2001) The supramammillary nucleus contributes to associative EPSP-spike potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* 13(4): 793-800.

Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 13940-5.

Nagel G, Brauner M, Jana F, Liewald JF, Nona Adeishvili N, Ernst Bamberg E, Gottschalk A (2005) Light activation of Channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current Biology* 15: 2279–2284.

Nelson AJ, Hindley EL, Pearce JM, Vann SD, Aggleton JP (2015) The effect of retrosplenial cortex lesions in rats on incidental and active spatial learning. *Front Behav Neurosci* 9:11.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of Neurobiology* 39(4): 569-578.

Niu JG, Yokota S, Tsumori T, Oka T, Yasui Y (2012) Projections from the anterior basomedial and anterior cortical amygdaloid nuclei to melanin-concentrating hormone-containing neurons in the lateral hypothalamus of the rat. *Brain Res* 1479: 31-43.

Oades RD, Rivet JM, Taghzouti K, Kharouby M, Simon H, Le Moal M (1987) Catecholamines and conditioned blocking: effects of ventral tegmental, septal and frontal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Brain Res* 406(1-2): 136-46.

Ohara S, Sato S, Tsutsui K, Witter MP, Iijima T (2013) Organization of multisynaptic inputs to the dorsal and ventral dentate gyrus: retrograde trans-synaptic tracing with rabies virus vector in the rat. *PLoS One* 8(11): e78928.

Oka T, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y (2008) Neuroanatomical and neurochemical organization of projections from the central amygdaloid nucleus to the nucleus retroambiguus via the periaqueductal gray in the rat. *Neurosci Res* 62(4): 286-98.

O' Mara S (2005) The subiculum : what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J. Anat* 207: 271-282.

Ottersen OP (1982) Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 205(1): 30-48.

Pan WX, McNaughton N (2002) The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. *Eur J Neurosci* 16(9): 1797-809.

Pan WX, McNaughton N (2004) The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog Neurobiol* 74(3): 127-66.

Paré D, Steriade M, Deschênes M, Oakson G (1987) Physiological characteristics of anterior thalamic nuclei, a group devoid of inputs from reticular thalamic nucleus. *J Neurophysiol* 57(6): 1669-85.

Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106(2): 274-85.

Pignatelli M, Beyeler A, Leinekugel X (2012) Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *J Physiol Paris* 106(3-4): 81-92.

Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM (1992) Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 49(4): 857-65.

Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911: 369-91.

Poulin JF, Castonguay-Lebel Z, Laforest S, Drolet G (2008) Enkephalin co-expression with classic neurotransmitters in the amygdaloid complex of the rat. *J Comp Neurol* 506(6): 943-59.

Prince TM et Abel T (2013) The impact of sleep loss on hippocampal function. *Learn. Mem* 20: 558-569.

Rahman FE, Baizer JS (2007) Neurochemically defined cell types in the claustrum of the cat *Brain Res* 1159: 94-111.

Raimondo JV, Kay L, Ellender TJ, Akerman CJ (2012) Optogenetic silencing strategies differ in their effects on inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 15(8): 1102-4.

Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 28(37): 9101-10.

Rasch B, Born J (2013) About sleep's role in memory. *Physiol Rev* 93(2): 681-766.

Ravassard P, Pachoud B, Comte JC, Mejia-Perez C, Scoté-Blachon C, Gay N, Claustrat B, Touret M, Luppi PH, Salin PA (2009) Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels, and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. *Sleep* 32(2): 227-40.

Ray S, Naumann R, Burgalossi A, Tang Q, Schmidt H, Brecht M (2014) Grid-layout and theta-modulation of layer 2 pyramidal neurons in medial entorhinal cortex. *Science* 343(6173): 891-6.

Rechtschaffen A, Bergmann BM (2002) Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep* 25(1): 18-24.

Renouard L, Billwiller F, Ogawa K, Clément O, Camargo N, Abdelkarim M, Gay N, Scoté-Blachon C, Touré R, Libourel PA, Ravassard P, Salvart D, Peyron C, Clausturat B, Léger L, Salin P, Malleret G, Fort P, Luppi PH (2015) The supramammillary nucleus and the claustrum activate the cortex during REM sleep. *Sci Adv* 1(3): e1400177.

Ribeiro S, Goyal V, Mello CV, Pavlides C (1999) Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem* 6(5): 500-8.

Ribeiro S, Mello CV, Velho T, Gardner TJ, Jarvis ED, Pavlides C (2002) Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* 22(24): 10914-23.

Ribeiro S, Nicolelis MA (2004) Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep. *Learn Mem* 11(6): 686-96.

Roberts LA, Higgins MJ, O'Shaughnessy CT, Stone TW, Morris BJ (1996) Changes in hippocampal gene expression associated with the induction of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 42(1): 123-7.

Robinson S, Poorman CE, Marder TJ, Bucci DJ (2012) Identification of functional circuitry between retrosplenial and postrhinal cortices during fear conditioning. *J Neurosci* 32(35): 12076-86.

Roffwarg HP, Muzio JN, Dement WC (1966) Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science* 152(3722): 604-19.

Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10: 423-433.

Ruskin DN, Liu C, Dunn KE, Bazan NG, LaHoste GJ (2004) Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *Eur J Neurosci* 19:3121-3124.

Sagar, SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240(4857): 1328-31.

Saha S, Datta S (2005) Two-way active avoidance training-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus, amygdala, and hypothalamus. *Eur J Neurosci* 21(12): 3403-14.

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472(7344): 466-70.

- Sainsbury RS, Bland BH (1981) The effects of selective septal lesions on theta production in CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Physiol Behav* 26(6): 1097-101.
- Sakai K (2011) Sleep-waking discharge profiles of dorsal raphe nucleus neurons in mice. *Neuroscience* 197: 200-24.
- Sakai K, el Mansari M, Lin JS, Zhang, JG, Vanni-Mercier, G (1990). The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep. *in* M. Mancia et G. Marini, (Eds), *The diencephalon and sleep*. Raven Press, New York.
- Sakata M, Sei H, Toida K, Fujihara H, Urushihara R, Morita Y (2002) Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation. *Brain Res* 928(1-2): 194-201.
- Salerno MT, Cortimiglia R, Crescimanno G, Amato G, Infantellina F (1984) Effects of claustrum stimulation on spontaneous bioelectrical activity of motor cortex neurons in the cat. *Exp Neurol* 86(2): 227-39.
- Sandner G, Di Scala G, Rocha B, Angst MJ (1992) C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. *Brain Res* 573(2): 276-83.
- Sándor P, Szakadát S, Bódizs R (2014) Ontogeny of dreaming: a review of empirical studies. *Sleep Med Rev* 18(5): 435-49.
- Santín LJ, Aguirre JA, Rubio S, Begega A, Miranda R, Arias JL (2003) c-Fos expression in supramammillary and medial mammillary nuclei following spatial reference and working memory tasks. *Physiol Behav* 78(4-5): 733-9.
- Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE (2010) Sleep state switching. *Neuron* 68: 1023-42.
- Sapin E, Bérød A, Léger L, Herman PA, Luppi PH, Peyron C (2010) A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One* 5(7): e11766.
- Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T (2011) Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One* 6(5): e20360.
- Sastre JP, Sakai K, Jouvet M (1981) Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* 229(1): 147-61.
- Sastre JP, Buda C, Lin JS, Jouvet M (2000) Differential c-fos expression in the rhinencephalon and striatum after enhanced sleep-wake states in the cat. *Eur J Neurosci* (4): 1397-410.
- Savić N, Sciancalepore M (2001) Electrophysiological characterization of "giant" cells in stratum radiatum of the CA3 hippocampal region. *J Neurophysiol* 85(5): 1998-2007.
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ (2012) Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation, *Behavioural Brain Research* 226 (1): 56–65.

Schmidt MH (2014) The energy allocation function of sleep: a unifying theory of sleep, torpor, and continuous wakefulness. *Neurosci Biobehav Rev* 47: 122-53.

Segal M (1979) A potent inhibitory monosynaptic hypothalamo-hippocampal connection. *Brain Res* 162(1): 137-41.

Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301:846-850.

Shahidi S, Motamedi F, Naghdi N (2004a) Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. *Brain Res* 1026(2): 267-74.

Shahidi S, Motamedi F, Bakeshloo SA, Taleghani BK (2004b) The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 152(1): 81-7.

Shen J, Kudrimoti HS, McNaughton BL, Barnes CA (1998) Reactivation of neuronal ensembles in hippocampal dentate gyrus during sleep after spatial experience. *J Sleep Res* 7 Suppl 1: 6-16.

Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271(5246): 216-9.

Shin R, Ikemoto S (2010) Administration of the GABAA receptor antagonist picrotoxin into rat supramammillary nucleus induces c-Fos in reward-related brain structures. Supramammillary picrotoxin and c-Fos expression. *BMC Neurosci* 11: 101.

Sil'kis IG (2009) Characteristics of the functioning of the hippocampal formation in waking and paradoxical sleep. *Neurosci Behav Physiol* 39(6): 523-34.

Silveira MC, Sandner G, Graeff FG (1993) Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 56(1): 115-8.

Silveira MC, Sandner G, Di Scala G, Graeff FG (1995) c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res* 674(2): 265-74.

Simon AP, Poindessous-Jazat F, Dutar P, Epelbaum J, Bassant MH (2006) Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats. *J Neurosci* 26(35): 9038-46.

Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G (2008) Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron* 60(4): 683-697.

Smith C et Rose GM (1996) Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 59(1): 93-7.

Smith C et Rose GM (1997) Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 111: 1197-1204.

Smith C (1996) Sleep states, memory processes and synaptic plasticity. *Behav Brain Res* 78(1): 49-56.

Smith JB, Radhakrishnan H, Alloway KD (2012) Rat claustrum coordinates but does not integrate somatosensory and motor cortical information. *J Neurosci* 32(25):8583-8.

Smythe JW, Colom LV, Bland BH (1992) The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci Biobehav Rev* 16(3): 289-308.

Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA (2009) Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19(4): 360-70.

Soussi R, Zhang N, Tahtakran S, Houser CR, Esclapez M (2010) Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. *Eur J Neurosci* 32(5): 771-85.

Steriade M, Sakai K, Jouvet M (1984) Bulbo-thalamic neurons related to thalamocortical activation processes during paradoxical sleep. *Exp Brain Res* 54(3): 463-75.

Steriade M, Deschenes M, Domich L, Mulle C (1985) Abolition of spindle oscillations in thalamic neurons disconnected from nucleus reticularis thalami. *J Neurophysiol* 54: 1473-97.

Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10(8): 2541-59.

Steriade M (2001) Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* 86(1): 1-39.

Stiedl O, Birkenfeld K, Palve M, Spiess J (2000) Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. *Behav Brain Res* 116: 157-168.

Suh J, Rivest AJ, Nakashiba T, Tominaga T, Tonegawa S (2011) Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. *Science* 334(6061): 1415-20.

Sun Y, Nguyen AQ, Nguyen JP, Le L, Saur D, Choi J, Callaway EM, Xu X (2014) Cell-type-specific circuit connectivity of hippocampal CA1 revealed through Cre-dependent rabies tracing. *Cell Rep* 7(1): 269-80.

Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172(1): 49-84.

Swanson LW (1977) The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp* 58: 25-48.

Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9(1-6): 321-53.

Swanson LW (2000) Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res* 886: 113–164.

Takahashi K, Lin JS, Sakai K (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci* 26(40): 10292-8.

Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 169(3): 1115-26.

Tamamaki N (1997) Organization of the entorhinal projection to the rat dentate gyrus revealed by Dil anterograde labeling. *Exp Brain Res* 116(2): 250-8.

Taube JS (2007) The head direction signal: origins and sensory-motor integration. *Annu Rev Neurosci* 30: 181-207.

Thakkar M, Portas C, McCarley RW (1996) Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res* 723(1-2): 223-7.

Thinschmidt JS, Kinney GG, Kocsis B (1995) The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience* 67(2): 301-12.

Thomas CE, Storm TA, Huang Z, Kay MA (2004) Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* 78(6): 3110-22.

Tobler I, Borbély AA (1986) Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 64(1): 74-6.

Tort AB, Komorowski RW, Manns JR, Kopell NJ, Eichenbaum H (2009) Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(49): 20942-7.

Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A (2011) Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci* 31(29): 10529-39.

Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, Yamanaka A (2014) Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci* 34(20): 6896-909.

Van Dort CJ, Zachs DP, Kenny JD, Zheng S, Goldblum RR, Gelwan NA, Ramos DM, Nolan MA, Wang K, Weng FJ, Lin Y, Wilson MA, Brown EN (2015) Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(2): 584-9.

Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA (2009) What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* 10(11): 792-802.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Léger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4: 19.

Verret L, Léger L, Fort P, Luppi PH (2005) Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* 21(9): 2488-504.

Verret L, Fort P, Gervasoni D, Leger L, Luppi PH (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J Comp Neurol* 495(5): 573-86.

Vertes RP, Martin GF (1988) Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 275(4): 511-41.

Vertes RP (1988) Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. *Neuroscience* 24(3): 907-35.

Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326(4): 595-622.

Vertes RP, Kocsis B (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* 340(1): 11-26.

Vogt BA, Peters A (1981) Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24, and 29. *J Comp Neurol* 195(4): 603-25.

Vyazovskiy VV, Tobler I (2005) Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat. *Brain Res* 1050(1-2): 64-71.

Vyazovskiy VV, Achermann P, Tobler I (2007) Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period. *Brain Res Bull* 74(1-3): 37-44.

Walker MP (2009) The role of slow wave sleep in memory processing. *J Clin Sleep Med* 5(2 Suppl): S20-6.

Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM (2000) Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J. Neurobiol.* 42, 248-257.

Wilson MA, McNaughton BL (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261(5124): 1055-8.

Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265(5172): 676-9.

Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T (2000) Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911: 1-24.

- Witter MP (2007) The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163: 43-61.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14(3): 316-27.
- Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM (1979) Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)* 156(2): 165-76.
- Yau S, Li A, So K (2015) Involvement of adult hippocampal neurogenesis in learning and forgetting. *Neural Plasticity* ID 717958.
- Yeckel MF, Berger TW (1990) Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(15): 5832-6.
- Yoshida K, Oka H (1995) Topographical projections from the medial septum-diagonal band complex to the hippocampus: a retrograde tracing study with multiple fluorescent dyes in rats. *Neurosci Res* 21(3): 199-209.
- Yoshihara H, De France JF (1976) Deep temporal lobe projections to the nucleus of the diagonal band of Broca. *Experientia* 32(1): 55-7.
- Zhang F, Aravanis AM, Adamantidis A, de Lecea L, Deisseroth K (2007) Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems *Nat Rev Neurosci* 8(8): 577-81.
- Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, Deisseroth K (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc* 5(3): 439-56.
- Zhao S, Cunha C, Zhang F, Liu Q, Gloss B, Deisseroth K, Augustine GJ, Feng G (2008) Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain Cell Biol* 36(1-4): 141-54.
- Zhu P, Narita Y, Bundschuh ST, Fajardo O, Schärer YP, Chattopadhyaya B, Bouldoires EA, Stepien AE, Deisseroth K, Arber S, Sprengel R, Rijli FM, Friedrich RW (2009) Optogenetic Dissection of Neuronal Circuits in Zebrafish using Viral Gene Transfer and the Tet System. *Front Neural Circuits* 3: 21.